

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



TESIS DOCTORAL

**Modificación química de grupos carboxilo en el fragmento  
FC y humano : localización de los residuos ácidos  
involucrados en sus funciones efectoras**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Rafael Bragado Herrero**

DIRECTOR:

**Fernando Ortiz Masllorens**

Madrid, 2015

Rafael Bragado Herrero

TP  
1982  
128



x-82-044215-2

MODIFICACION QUIMICA DE GRUPOS CARBOXILO EN EL FRAGMENTO  
FC HUMANO: LOCALIZACION DE LOS RESIDUOS ACIDOS INVOLUCRADOS  
EN SUS FUNCIONES EFECTORAS

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Complutense de Madrid  
1982



• • • • • BIBLIOTECA

**Colección Tesis Doctorales. Nº 128/82**

**© Rafael Bragado Herrero**

**Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3 Madrid-8  
Madrid, 1981**

**Xerox 9200 XB 480**

**Depósito Legal: M-16192-1982**

Autor: RAFAEL BRAGADO HERRERO

MODIFICACION QUIMICA DE GRUPOS CARBOXILO EN EL  
FRAGMENTO Fc<sub>γ</sub> HUMANO: LOCALIZACIÓN DE LOS RESIDUOS  
ACIDOS INVOLUCRADOS EN SUS FUNCIONES EFECTORAS.

Director: Fernando Ortiz Masllorens  
Dr. en Medicina, Director del Departamento  
de Inmunología de la Fundación Jiménez Díaz.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
Facultad de Ciencias Químicas  
Departamento de Bioquímica  
Año 1981



El presente trabajo ha sido realizado en el Instituto de Investigaciones Médicas de la Fundación Jiménez Díaz, - bajo la dirección del Dr. Fernando Ortiz Masllorens, jefe del Departamento de Inmunología.

Mi sincera gratitud, en primer lugar, al Dr. Ortiz/ cuya disciplina en su vida de trabajo, dedicación, rigor y es píritu crítico han sido un estímulo constante e indispensable para la realización de esta Tesis Doctoral.

Agradezco también al Prof. Dr. Angel Martín Municio, que me ha honrado con aceptar la ponencia de esta Tesis, los/ conceptos bioquímicos que supo inculcarme durante mi formación universitaria.

Quiero expresar, asimismo, mi agradecimiento a todos mis compañeros de Laboratorio, y muy especialmente a los Dres. José Antonio López de Castro, Angeles García Pardo, Cándido - Juárez y Fernando Vivanco, que han posibilitado la realización de esta Tesis. Mi gratitud también hacia Gonzalo González Bui trago, Dr. Martín Martínez Ripoll y Dr. Johann Deisenhofer -- por su colaboración en distintos aspectos de la misma.

Por último no puedo olvidar las enormes facilidades dispensadas por la Fundación Jiménez Díaz así como la Beca -- concedida por la Caja de Ahorros y Monte de Piedad de Madrid/ y que he disfrutado durante los tres últimos años.



INDICE

1. INTRODUCCION .....	1
1.1. Diversidad .....	4
1.1.2. Estructura general de los anticuerpos .....	4
1.1.2.1. Cadenas ligeras .....	6
1.1.2.2. Cadenas pesadas .....	6
1.1.3. El problema .....	7
1.1.4. Organización y expresión de los genes de los an- ticuerpos .....	12
1.1.4.1. Cadenas ligeras .....	12
1.1.4.2. Cadenas pesadas .....	17
1.1.4.2.1. El switch (cambio) de las cadenas pesadas ...	19
1.2. Flexibilidad .....	24
1.3. Multifuncionalidad .....	28
1.3.1. Estructura del fragmento Fc .....	28
1.3.1.1. El dominio $C_H2$ y el carbohidrato .....	30
1.3.1.2. El dominio $C_H3$ y los contactos $C_H3-C_H3$ y $C_H2--$ $C_H3$ .....	32
1.3.2. Funciones efectoras .....	34
1.3.2.1. Activación del complemento (Vía Clásica) .....	37
1.3.2.1.1. Estructura del Clq .....	37
1.3.2.1.2. La unión anticuerpo-Clq .....	41
1.3.2.2. Unión a receptores celulares .....	44
1.3.2.2.1. Unión a linfocitos .....	44
1.3.2.2.2. Unión a monocitos y macrófagos .....	45
1.3.2.2.3. Unión a mastocitos y basófilos .....	46
1.3.2.2.4. Unión a neutrófilos .....	47
1.3.2.2.5. Paso a través de la placenta .....	48
1.3.2.3. Interacción con la Proteína A del S. aureus ..	49
1.3.2.4. Interacción con el factor reumatoide .....	51



2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO .....	54
3. MATERIALES Y METODOS .....	60
3.1. Aislamiento, purificación y modificación química - del fragmento Fc .....	61
3.1.1. Obtención de IgG humana .....	61
3.1.2. Digestión enzimática de la IgG .....	61
3.1.3. Cromatografía en DEAE-celulosa .....	62
3.1.4. Filtración en gel .....	62
3.1.5. Control de pureza .....	63
3.1.5.1. Inmunodifusión doble bidimensional .....	63
3.1.5.2. Inmunoelectroforesis .....	63
3.1.5.3. Filtración en gel .....	63
3.1.5.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida en pre sencia de SDS .....	64
3.1.5.4.1. Preparación de los geles .....	64
3.1.5.4.2. Desarrollo de la electroforesis .....	64
3.1.6. Modificación química de grupos carboxilo .....	66
3.2. Estudio de funciones biológicas .....	67
3.2.1. Interacción con receptores celulares .....	67
3.2.1.1. Aislamiento de neutrófilos humanos .....	67
3.2.1.2. Sensibilización de eritrocitos de carnero ....	68
3.2.1.3. Formación de rosetas .....	68
3.2.1.4. Inhibición de la formación de rosetas .....	69
3.2.2. Interacción con el factor reumatoide .....	69
3.2.2.1. Elección del suero .....	69
3.2.2.2. Inactivación y absorción del suero .....	70
3.2.2.3. Sensibilización de eritrocitos .....	70
3.2.2.4. Determinación del título de aglutinación .....	70
3.2.2.5. Inhibición de la aglutinación .....	70
3.2.3. Interacción con la Proteína A del S. aureus ....	71
3.3. Localización de grupos carboxilo .....	71

-III-

3.3.1. Obtención de $Fc_{\gamma}1$ .....	71
3.3.2. Modificación química en condiciones radiactivas. ....	72
3.3.3. Reducción y alquilación .....	72
3.3.4. Digestión con tripsina .....	73
3.3.5. Purificación de péptidos .....	73
3.3.5.1. Cromatografía de cambio iónico .....	73
3.3.5.1.1. Preparación de la columna .....	73
3.3.5.1.2. Desarrollo de la cromatografía .....	73
3.3.5.1.3. Detección de péptidos .....	75
3.3.5.2. Cromatografía preparativa en capa fina .....	76
3.3.5.3. Cromatografía líquida de alta presión .....	76
3.3.6. Caracterización de péptidos radiactivos .....	77
3.3.6.1. Análisis de aminoácidos .....	77
3.3.6.2. Determinación de las secuencias .....	77
3.3.6.2.1. Determinación de Pths e identificación de re siduos radiactivos .....	79
3.3.6.3. Determinación de la actividad específica .....	80
3.3.7. Análisis de accesibilidad .....	80
4. RESULTADOS .....	82
4.1. Aislamiento, purificación y modificación química - del fragmento $Fc$ .....	83
4.1.1. Obtención de la IgG humana .....	83
4.1.2. Digestión enzimática de la IgG .....	85
4.1.3. Cromatografía en DEAE-celulosa .....	85
4.1.4. Filtración en gel .....	85
4.1.5. Control de pureza .....	88
4.1.5.1. Inmunodifusión doble bidimensional .....	88
4.1.5.2. Inmunolectroforesis .....	88
4.1.5.3. Filtración en gel .....	89
4.1.5.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida en pre sencia de SDS .....	91

-IV-

4.1.6. Modificación química de grupos carboxilo .....	91
4.2. Estudio de funciones biológicas .....	95
4.2.1. Interacción con receptores celulares .....	95
4.2.1.1. Aislamiento de neutrófilos humanos .....	95
4.2.1.2. Formación de rosetas .....	95
4.2.1.3. Inhibición de la formación de rosetas .....	96
4.2.2. Interacción con el factor reumatoide .....	96
4.2.2.1. Determinación del título de aglutinación .....	96
4.2.2.2. Inhibición de la aglutinación .....	98
4.2.3. Interacción con la Proteína A del S. aureus ....	99
4.3. Localización de grupos carboxilo .....	100
4.3.1. Obtención de Fc <sub>γ</sub> 1 .....	100
4.3.2. Modificación química radiactiva de grupos carbo- xilo .....	101
4.3.3. Purificación de péptidos .....	101
4.3.3.1. Cromatografía de cambio de ión .....	101
4.3.3.2. Cromatografía líquida de alta presión .....	103
4.3.4. Caracterización de péptidos radiactivos .....	104
4.3.4.1. Análisis de aminoácidos .....	104
4.3.4.2. Determinación de la secuencia .....	104
4.3.4.2.1. Cuantificación del marcaje .....	108
4.3.5. Análisis de accesibilidad .....	110
5. DISCUSION .....	112
6. CONCLUSIONES .....	124
7. BIBLIOGRAFIA .....	127

I.- INTRODUCCION.

Es evidente que los organismos multicelulares deben emplear una gran variedad de mecanismos para controlar su medio interno. En tales organismos existe un elevado número de metas que están, a menudo, en competición con unos recursos limitados y todo ello subordinado a la supervivencia reproductora de las especies. Es lógico, por tanto, suponer que si se fija la atención sobre una determinada función en el organismo se deben identificar los mecanismos que regulan su actividad. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la función bajo exámen es sólo una parte de un sistema mucho mayor y no debe tratarse siempre como si fuera una constante. Además, ciertos sistemas de control biológico a menudo parecen ser ineficientes o innecesariamente complejos. De hecho, estos aspectos sólo lo reflejarían nuestra imperfecta comprensión de los sistemas y probablemente debido a la carga que arrastran proveniente de estadíos tempranos en su evolución.

Así, los Vertebrados poseen sistemas integrados para hacer frente a las invasiones de material extraño procedentes del entorno o de modificaciones de su medio interno que juegan un papel crucial en su homeostasis. Conceptualmente estos sistemas se pueden englobar en dos grandes grupos: los constitutivos y los adaptativos. (Figura 1).

En la primera categoría, la necesidad de enfrentarse a cambios que se desarrollan espontanea y consecuentemente al envejecimiento molecular, al trauma o al crecimiento celular neoplásico permite especular que sistemas accesorios de la inmunidad, como el sistema del complemento y las células fagocitarias, se desarrollaron antes, filogeneticamente hablando, ya que actividades mediadas por estos elementos están representadas en Invertebrados y no tienen especificidad inherente para ningún antígeno en particular.

Sin embargo, la necesidad ineludible de responder a/ productos particulares y a organismos en cualquier parte o vía de acceso al cuerpo desembocó en la evolución de una sofisticada malla de mecanismos inmunes específicos que involucran tanto elementos celulares (por ejemplo: linfocitos T y B) como humorales (anticuerpos).

De particular interés es el papel que juegan estos - anticuerpos en integrar o correlacionar ambos tipos de proce-- sos. Esto es posible gracias a tres características inherentes y distintivas que exhiben este tipo de moléculas: Diversidad, - Flexibilidad y Multifuncionalidad.

## ESTIMULO

## RECONOCIMIENTO

## RESPUESTA

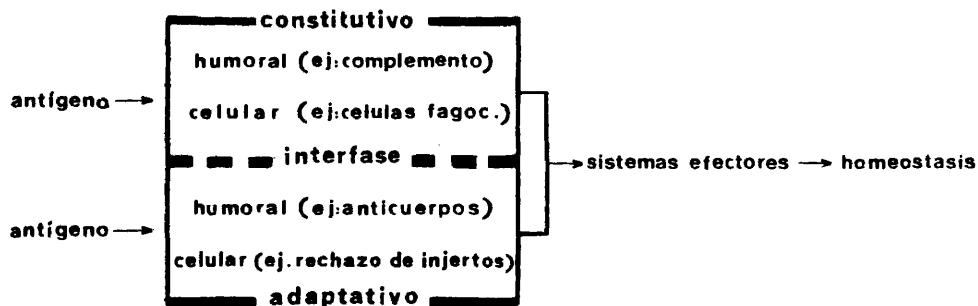


Figura 1.

### 1.1. DIVERSIDAD

El origen de la diversidad de los anticuerpos, es decir, de la capacidad de un animal para sintetizar alrededor de un millón de anticuerpos diferentes (1) es un problema aún no resuelto en su totalidad.

Historicamente esta problemática nace como consecuencia de los resultados obtenidos en los estudios estructurales/ de las inmunoglobulinas.

#### 1.1.2. Estructura general de los anticuerpos.

Anticuerpo es un concepto funcional que designa a la proteína que se origina en respuesta a un estímulo antigénico/ adecuado y es capaz de combinarse específicamente con el mismo antígeno que dio lugar a su formación o con sustancias de estructura muy similar. Inmunoglobulina es un concepto estructural y comprende a todas las proteínas que poseen unos rasgos - estructurales comunes y característicos, posean o no actividad anticuerpo reconocida. Ambos conceptos, sin embargo, tienden a unificarse puesto que todos los anticuerpos son inmunoglobulinas y teóricamente cualquier inmunoglobulina podría funcionar/ como anticuerpo contra un posible antígeno, al menos en lo que a su capacidad de combinación específica se refiere.

La estructura básica consiste en cuatro cadenas polipeptídicas, dos ligeras -L- (PM 25000 Dalton) y dos pesadas -H- (PM 52000-70000 Dalton), que se mantienen unidas por fuerzas no covalentes y habitualmente por puentes disulfuro intercatenarios.

Conformacionalmente, cada cadena está constituida -- por un número de dominios globulares, de dimensiones aproximadamente constantes, mantenidos por puentes disulfuro e interacciones no covalentes (Figura 2). La presencia de polímeros que

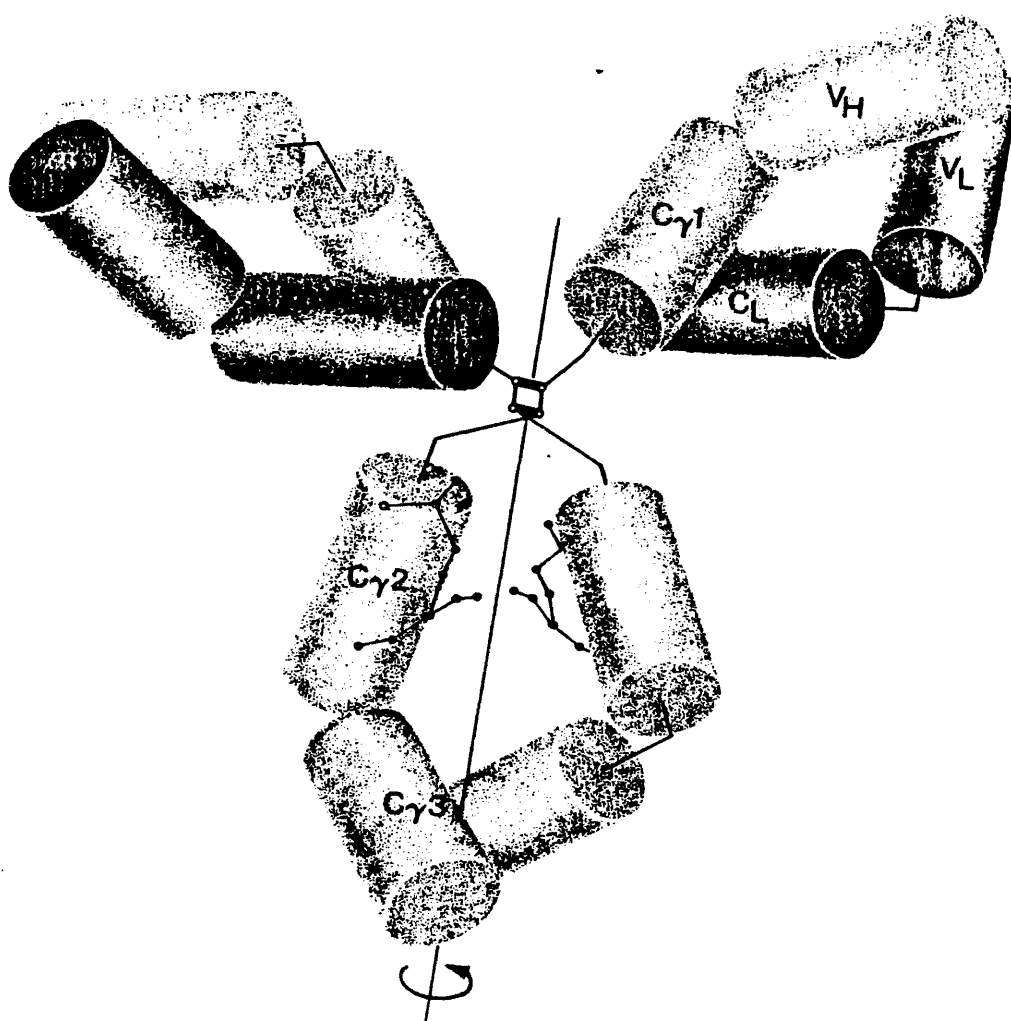


Figura 2.- Molécula de Inmunoglobulina G



proporcionan estructuras de orden superior implica que la fórmula general de estas moléculas sea  $(H_2L_2)_n$ .

#### 1.1.2.1. Cadenas ligeras.

Las cadenas ligeras pueden ser divididas en dos regiones: una que comprende la mitad  $NH_2$ -terminal de la cadena polipeptídica,  $V_L$ , y que presenta una gran variabilidad de secuencia al comparar las distintas cadenas ligeras y otra que comprende la mitad  $COOH$ -terminal y que presenta mucha menos variabilidad,  $C_L$ . Variaciones en la secuencia de estas partes  $C_L$  son la base de su clasificación en dos tipos: Kappa.-K- y Lambda.-λ-. Ambas regiones contienen un puente disulfuro intracatenario que encierra un segmento de unos 60 residuos.

Dentro de la región variable se distinguen tres pequeños segmentos alrededor de las posiciones 30, 50 y 90 en los que la diversidad secuencial entre las distintas cadenas ligeras es muy elevada; reciben el nombre de regiones hipervariables. El resto de esta región se conoce como armazón, ya que presenta menor variabilidad, y determina el subgrupo al que pertenece la cadena ligera completa.

#### 1.1.2.2. Cadenas pesadas.

Las cadenas pesadas pueden ser divididas en cuatro regiones, cinco en algunos casos, cada una de las cuales contiene un puente disulfuro intracatenario semejante a los descritos en las cadenas ligeras. La parte variable,  $V_H$ , es similar a  $V_L$  pero en este caso se han definido cuatro segmentos hipervariables alrededor de las posiciones 33, 57, 83 y 98 (2). Residuos localizados en estas posiciones junto con los definidos en las cadenas ligeras hacen contacto directo con el antígeno o bien configuran el centro de unión siendo, por tanto, -

los que determinan la especificidad del anticuerpo. La región/armazón, en este caso, determina los distintos subgrupos de la cadena pesada.

El resto de la cadena, aproximadamente las 3/4 partes, se puede agrupar bajo un pequeño número de secuencias polipeptídicas fundamentales que definen la clase a la que pertenece el anticuerpo ( en el hombre hay cinco: G, A, M, D y E )./ A su vez, dentro de una determinada clase se observan pequeñas diferencias que determinan la subclase.

Esta parte constante comprende tres regiones:  $C_H1$ , -  $C_H2$  y  $C_H3$  ( en el caso de la IgM e IgE existe una región adicional,  $C_H4$  ) que muestran una elevada homología secuencial, tanto entre sí como con la región  $C_L$ .

Los puentes disulfuro entre las cadenas pesadas se - suelen situar en un segmento, rico en prolina, que se extiende entre  $C_H1$  y  $C_H2$ . Dicha región se conoce por gozne y no presenta homología con cualquier otra región.

Ya que, como hemos dicho, el sitio de unión al antígeno resulta de la interacción entre  $V_H$  y  $V_L$ , la diversidad de anticuerpos refleja exclusivamente la diversidad de las regiones variables.

### 1.1.3. El problema.

Desde que fue posible comparar un cierto número de - secuencias de aminoácidos de cadenas de inmunoglobulinas homogeneas era obvio el plantearse:

- 1º.- ¿ Cual es el origen de la extremada variabilidad de las - regiones  $NH_2$ -terminales con las que se conforma el sitio/ de reconocimiento y unión al antígeno?
- 2º.- ¿ Cómo un gran número de regiones variables, V, pueden ex - presarse asociadas con un pequeño número de regiones cons

tantes, C ?

Evidentemente ambas preguntas habían de responderse/ en términos genéticos de forma que se postularon tres teorías/ con objeto de dar cuenta de este problema.

#### TEORIA DE LA LINEA GERMINAL

De acuerdo con esta teoría los genes de los anticuerpos están codificados en la línea germinal colinealmente con la estructura de cada subunidad de inmunoglobulina, es decir, / que la estructura primaria de cualquier región V que un animal puede sintetizar está codificada en su DNA y, por tanto, miles de genes de cadenas ligeras y pesadas están codificados con las regiones V y C adyacentes unas a otras.

La innecesariedad de entender las inmunoglobulinas como un sistema genético diferente, ya que la enorme diversidad intrínsecamente codificada puede explicarse, en términos de evolución genética, de forma semejante a la presencia de miles de genes diferentes para otras proteínas o enzimas, constituye la base de esta teoría. (3, 4, 5).

Una implicación inmediata, sin embargo, era la necesidad de postular miles de segmentos discretos de DNA, divididos de alguna manera, para que durante la evolución pudiera variar la porción inicial mientras que la porción terminal fuera mantenida absolutamente constante. La selección, por su parte, sólo proporcionaría un mecanismo satisfactorio para mantener inalterada la secuencia de la región constante, ya que estaba claro que tanto las regiones constantes de las cadenas ligeras como de las pesadas toleraban sustituciones de amino ácidos.

Dreyer y Bennett (6) obviaron esta dificultad postulando la existencia de dos genes estructurales para codificar una sola cadena polipeptídica: uno para la región V, del cual existirían múltiples copias en la línea germinal, y uno para -

la región C del cual existiría una sola copia para cada clase o subclase. Este único gen C sería capaz de unirse a cualquiera de los muchos genes V. Como veremos más adelante su modelo/ ha resultado ser esencialmente correcto.

#### TEORIA DE LA MUTACION SOMATICA

Este mecanismo de generación de diversidad era inherente a la teoría de la selección clonal originalmente propuesta por Burnet (7). Se supone que sólo un pequeño número de genes estarían presentes en la línea germinal de forma que la diversidad se generaría por mutación durante la división mitótica inherente al crecimiento somático del organismo (8). La velocidad de mutación puede ser excepcionalmente alta o similar/ a la observada en otros loci eucarióticos, dependiendo del enfoque de la teoría.

El número de mutantes V aumentaría rápidamente durante la ontogenia bien por deriva al azar de mutaciones selectivamente neutras dentro de la población celular o más probablemente por fuertes presiones selectivas contra aquellas células que no mutan (9) y por la más rápida proliferación de aquellas células que expresan regiones V que unen antígenos del entorno. (10). Este último proceso se parece a la selección natural observada en los organismos, ya que las células que producen anticuerpos de alta afinidad se dividen con mayor velocidad aumentando entonces la progenie, la cual, a su vez, es capaz de/ formar anticuerpos de mayor afinidad y así sucesivamente.

La enorme facilidad para generar diversidad, implícita en este modelo, tiene una contrapartida doble: a) La producción de anticuerpos contra antígenos que nunca se van a encontrar en el organismo; b) La necesidad de mantener un sistema - de control, superior al de las células B, para seleccionar clo

nes indeseables (por ejemplo, autoinmunes) por un lado y clones útiles por otro.

#### TEORIA DE LA RECOMBINACION SOMATICA

De la misma forma que la Teoría de la Línea Germinal esta teoría presupone que los genes V evolucionaron igual que otros genes estructurales, es decir, por un proceso de selección natural de mutaciones puntuales favorables. Además, estos genes V se presentan en familias de secuencias de nucleótidos/ordenadas que han sido generadas por duplicación génica. Pero/ a diferencia de aquella postula que estas secuencias ordenadas son inestables tanto en la línea germinal como en las células/ somáticas en división (11). Ya que debido a las duplicaciones/ en número de genes V en el genoma iría en aumento, es lógico - suponer que aumenta la probabilidad de recombinación por sobre cruzamiento de forma que, aún en estadíos tempranos, no sería/ raro encontrar que dos células somáticas no contienen el mismo conjunto de genes V presentes en la línea germinal. Incluso se puede generar más diversidad asumiendo la existencia de traslo cación de genes en la misma banda de DNA.(12).

El descubrimiento de múltiples segmentos de DNA (13, 14, 15) necesarios para la expresión completa de las cadenas - de inmunoglobulinas aumenta la validez de esta teoría, ya que existe una potencialidad mayor en la copacidad de generación - de diversidad al aumentar las posibilidades de unión combinato rial entre los diversos genes (16).

La unión combinatorial como mecanismo de generación/ de diversidad, pero desde el punto de vista de que ciertas re- giones hipervariables pueden estar asociadas con muchas regio- nes armazón, ha sido propuesta por algunos autores (17, 18). - Así, Kabat y col. (19) en su modelo de los "mini-genes" sugie-

ren que cada una de las regiones hipervariables y armazón estarían, en la línea germinal, codificadas por mini-genes diferentes separados por secuencias inespecíficas, de forma que durante la diferenciación se ensamblarían por eliminación de esas secuencias y posterior inserción de los mini-genes hipervariables entre los segmentos armazón. Sin embargo, no se han encontrado ordenamientos de este tipo en líneas germinales (20, 21).

Debido a la enorme diversidad de criterios, la contribución específica de cada teoría a explicar la generación de diversidad continúa siendo uno de los objetos de investigación en el campo de la inmunogenética.

Hasta aproximadamente 1974 la evidencia experimental indicaba que había pocos genes en la línea germinal y que la mutación somática explicaba la mayor parte de la diversidad de anticuerpos en base, sobre todo, a los datos de secuencia que se tenían sobre cadenas  $\lambda$  de ratón que representan alrededor del 5% del total de las cadenas ligeras en esta especie y cuyo patrón de variabilidad era muy simple (22 - 26). Datos obtenidos a partir de secuenciación de genes confirman que la variabilidad en estas cadenas aparece somáticamente por mutación de un gen  $V_\lambda$  de la línea germinal (27, 28).

Sin embargo, con respecto al número de genes V de la cadena K se han establecido, en base a las similitudes en secuencia de amino ácidos, 50 grupos que codificarían para todas las cadenas (22). A su vez, cada grupo puede dividirse en 6 o 7 subgrupos (29). Si cada uno de ellos requiere un gen distinto, el número total de genes K presentes en la línea germinal sería unos 350.

Si se admite como 80 el número de genes  $V_H$  la asociación combinatorial máxima entre cadenas H y L generaría del orden de  $3 \times 10^4$  tipos diferentes de anticuerpos (30). Tenien

do en cuenta que alrededor de  $10^6$  es el número de anticuerpos/ diferentes que un individuo es capaz de producir, queda claro/ que los genes de la línea germinal sólo darían cuenta de cerca del 10% de la diversidad y que por tanta más del 90% del repertorio de los anticuerpos debe explicarse por mecanismos de diversificación somática.

Uno de los mecanismos era la unión combinatorial de múltiples segmentos de DNA (J o D) con los segmentos V. Si tomamos como 5 el número de segmentos  $J_K$  (31, 32) y un valor similar para  $V_H$ , entonces el repertorio se elevaría por encima de  $10^6$ . No es de extrañar, pues, que actualmente se sugiera -- que el repertorio de genes presentes en la línea germinal junto con su unión combinatorial sean las principales fuentes de diversidad (33, 34, 35).

No obstante, es de suponer que no todas las uniones/ y asociaciones son posibles ya que se sabe que las mutaciones/ somáticas existen (21, 25, 29, 36) y que los puntos de unión - de V, J y D son capaces de generar por sí mismos más diversidad (31, 32, 37, 38). Además algunos autores piensan que no todos los grupos han sido identificados (39) aunque en general - la mutación somática queda relegada a un segundo nivel con respecto al número de genes de la línea germinal (39, 40).

#### 1.1.4. Organización y expresión de los genes de los anticuerpos.

##### 1.1.4.1: Cadenas ligeras.

La cadena ligera se sintetiza como un precursor más/ largo que el producto que secreta la célula plasmática, ya que contiene en su región  $NH_2$ -terminal un péptido adicional, no generador de diversidad, marcadamente hidrofóbico (41) que parece jugar un papel en el transporte intracelular y en la inte--

racción con membranas.

La utilización de endonucleasas de restricción permitió a Hozumi y Tonegawa (42) demostrar que los genes de las regiones variable y constante están situados en distintos --- fragmentos del DNA embrionario, mientras que estos mismos genes están en el mismo fragmento del DNA obtenido a partir de células plasmáticas. De esta forma la predicción de Dreyer y Bennett (6) quedó ratificada evidenciando, además, que la --- aproximación por recombinación somática entre los genes V y C tiene lugar a nivel de DNA.

Además de confirmar estos datos, la tecnología de - DNA recombinante junto con estudios detallados de secuencia - han revelado características inesperadas de la estructura de/ los genes de las cadenas ligeras. Así, se vio que el gen de - la región  $V_K$  solamente codificaba amino ácidos hasta la posición 95, aunque convencionalmente a esa región se le asignaba hasta la posición 108 (20, 43). Los 13 codones restantes se - encontraban codificados a una cierta distancia del extremo 5' del gen C (31). Este segmento codificante, segmento J, no sólo contenía la información de los codones restantes de la región V, sino que también especificaba el sitio en el cual la/ región V se va a unir a la región C para formar un gen activo. Desde este punto de vista, los genes para las cadenas K y  $\lambda$  - parecen ser similares.

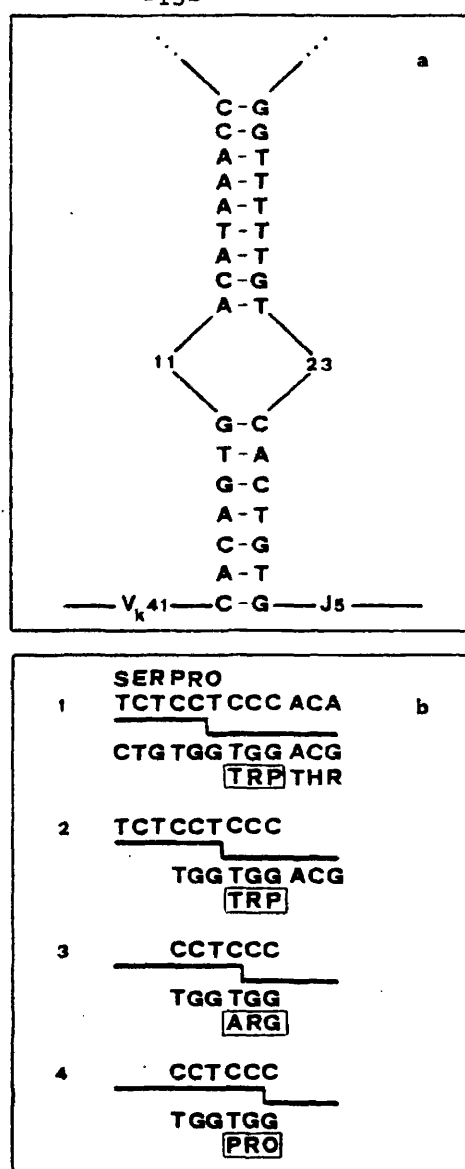
Sin embargo, una característica adicional de la estructura de los genes  $V_K$  de ratón es que no poseen un sólo -- segmento J, como en el caso de los genes  $V_\lambda$  (31). Su enorme - diversidad de secuencia de aminoácidos, que la hacen ser un caso más representativo de lo que ocurre en humanos, sugerían una fuente adicional de diversidad que fue confirmada por la demostración de la presencia de 5 segmentos  $J_K$  (31, 32). Cua-



tro de ellos no están restringidos a ningún grupo. Sin embargo, el fragmento central, J3, codifica para una secuencia nunca encontrada, y se ha sugerido que la existencia de un cambio de un nucleótido en su extremo 3' inactiva la señal necesaria para el splicing (unión) posterior del RNA (32).

Aunque no se ha encontrado ningún segmento adicional en la proximidad del gen  $C_K$ , la inspección de las secuencias conocidas de mielomas K seguía indicando más variabilidad en la región correspondiente a la unión de V y J, la cual cae en la tercera región determinante de complementariedad o hipervariable (16). El estudio de la secuencia de nucleótidos que siguen a los  $V_K$  embrionarios y preceden a cada uno de los segmentos J ha sugerido un posible mecanismo por el que esto puede ocurrir. En efecto, después del codón 95, en todos los genes  $V_K$  estudiados, aparecen dos secuencias: Un heptámero --CACAGTG que representa un palíndromo casi perfecto, y un nonámero ACAAAAACC con sólo uno o dos cambios de base. Similarmente a esto, aparecen dos secuencias conservadas en el extremo 5' de los segmentos J que derivan de CACTGTG y GGTTTTGT./ La orientación de estas secuencias es tal que se podría formar una estructura en horquilla por apareamiento de secuencias complementarias dentro de cada banda de DNA (Figura 3a).

Otra característica importante de estas secuencias es que la longitud de separación entre ellas está altamente conservada. Así, en las cadenas K, los espaciadores de los segmentos V son 11 o 12 pares de bases, mientras que los de los segmentos J son de 21 a 24 pares de bases. Lo contrario ocurre con las cadenas  $\lambda$ . Curiosamente estas distancias corresponden, respectivamente, con 1 y 2 pasos de rosca de la doble hélice y no han faltado autores (21, 44) que proponen la existencia de dos proteínas diferentes pero íntimamente re-



**Figura 3.-** (a) Apareamiento de secuencias complementarias de V y J.  
 (b) Variación en el punto de sobrecruzamiento de V y J durante la recombinación.

lacionadas que formando un complejo reconocen las secuencias - espaciadoras constantes y realizan el corte y la unión a nivel de DNA. Está descrito que son los palíndromes los que actúan como sitios de reconocimiento para enzimas que modifican o se unen al DNA (45, 46).

Independientemente del mecanismo que conduce a la unión de los segmentos V y J, por delección de la secuencia intermedia (31), la consecuencia evidente de la naturaleza flexible de la recombinación V/J es una fuente adicional de diversidad en la posición 96 (31, 32, 47). La variabilidad en esta posición crítica, que puede contribuir a una diversidad/fisiológica alterando la especificidad del anticuerpo (48), puede explicarse si se asume que puede variar el punto de entrecruzamiento de V y J durante la recombinación. Las consecuencias de tal variación se muestran en la Figura 3b, donde se han escogido como ejemplos las secuencias  $V_{K41}$  y J5. Como se ve, en los casos 3 y 4 el entrecruzamiento genera Arg y -- Pro al utilizar un punto de recombinación diferente de los -- mostrados en 1 y 2, los cuales retienen la secuencia de la -- línea germinal. La confirmación de que tales variaciones pueden ocurrir en el punto de recombinación ha sido realizada al determinarse la secuencia de nucleótidos en recombinantes de mielomas (34).

Queda por aclarar un aspecto de la diversidad somática observada en ciertas secuencias de la región V. En estudios de secuencia de cadenas  $\lambda$  de ratones BALB/c han sido descubiertas alteraciones puntuales de amino ácidos que están localizadas en las regiones hipervariables y que forman parte del sitio combinante del anticuerpo (30). Alteraciones similares se han observado en cadenas K de ratones NZB (49). La secuencia de nucleótidos de los genes de una de estas cadenas -

reveló cambios discretos que diferían de la secuencia presente en la línea germinal y que daban cuenta de la secuencia -- amino ácida observada.(25). Aunque se desconocen las bases moleculares para estas mutaciones puntuales, se ha sugerido que su origen está en los cambios de secuencia que acompañan a la recombinación V/J en los que participa un sistema de reparación del DNA que por un error podría dispersar los cambios a considerable distancia del sitio de recombinación (50). Sin embargo, a pesar de lo atractivo de la sugerencia, tal error no explicaría la aparente especificidad que sugieren las alteraciones localizadas. La solución a este problema debe venir de la observación de un mayor número de secuencias de regiones V.

La Figura 4 representa un esquema de los reordenamientos del DNA embrionario y procesamiento del RNA conducentes a la expresión de cadenas ligeras  $\lambda$  (A) y K(B).

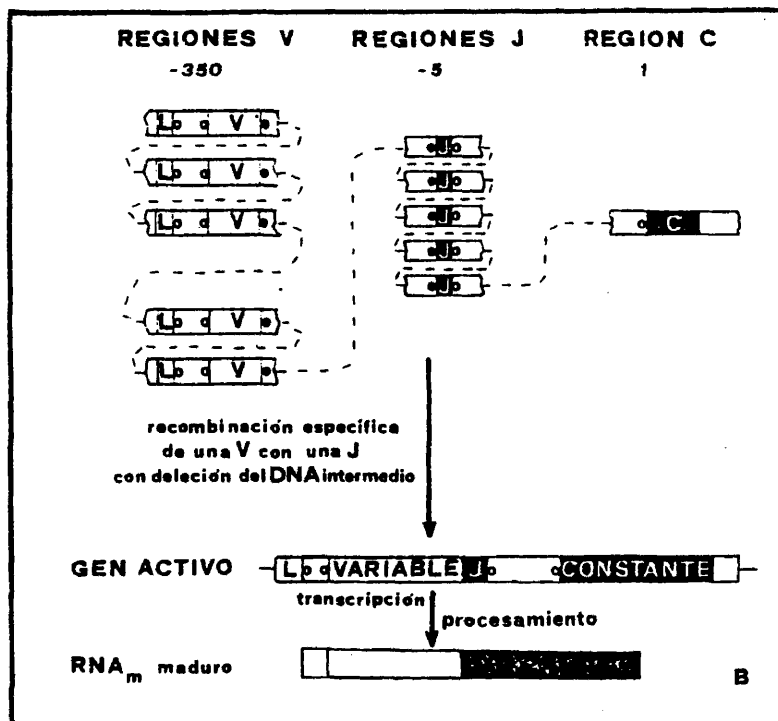
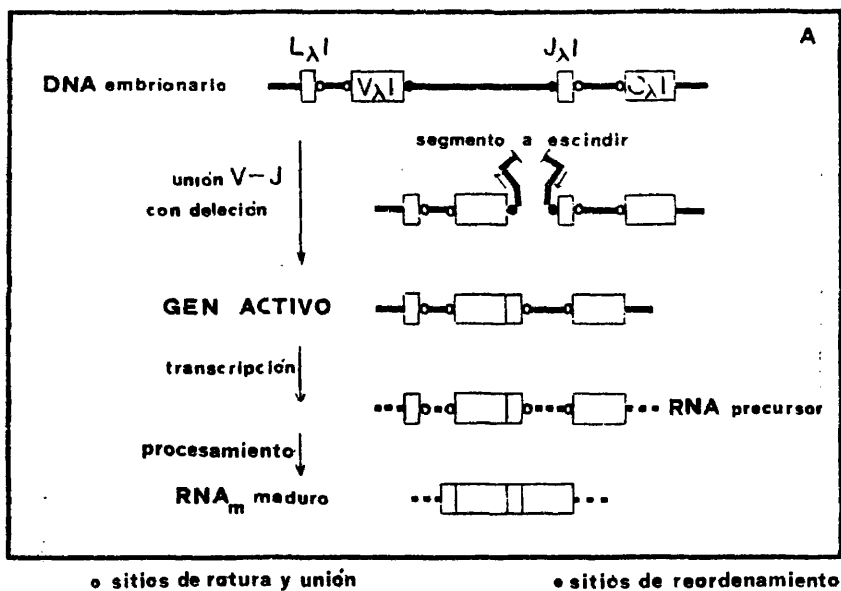
#### 1.1.4.2. Cadenas pesadas.

Contrariamente a lo que ocurre en las cadenas ligeras, los 4 segmentos J de las cadenas pesadas,  $J_H$  (51), no se asocian directamente con los segmentos  $V_H$ .

Evidencia de ello nace de los estudios en mielomas/de ratón (21, 44) donde ciertos residuos de la región hipervariable no se encuentran codificados en el segmento  $V_H$  ni en el  $J_H$  de la línea germinal.

La reciente identificación de unos segmentos de DNA que dan cuenta de los codones necesarios para formar la cadena completa (35, 38), han confirmado la suposición de la necesidad de segmentos adicionales de DNA, generadores de diversidad, sugeridos por ciertos autores (52).

Estos segmentos, denominados como D, contienen en cada extremo de la porción codificante las mismas secuencias/



**Figura 4.-** Reordenamientos del DNA embrionario y del RNA conducentes a la expresión de cadenas ligeras  $\lambda$  (A) y  $\kappa$  (B).

de reconocimiento descritas en las cadenas ligeras y, como era previsible, la longitud del espaciador en ambos casos es de 12 pares de bases. De esta manera las cadenas pesadas se unen a la regla de los 12/23 pares de bases descrita para las cadenas ligeras.

Es de señalar que esta regla prohíbe recombinaciones del tipo  $V_\lambda$  con  $J_K$  o  $V_K$  con  $J_\lambda$ . Sin embargo, permite algunas como  $V_H$  y  $J_\lambda$ ,  $D$  y  $J_K$  o  $V_\lambda$  y  $V_K$ . Esta puede ser la razón de que las tres familias multigénicas (K,  $\lambda$  y H) estén distribuidas en tres cromosomas diferentes.

Logicamente, el reordenamiento del DNA que conduce a la formación del gen nativo de la región variable requiere dos recombinaciones (V/D y D/J) con las deleciones correspondientes de las secuencias intermedias (35, 53, 54).

#### 1.1.4.2.1. El switch (cambio) de las cadenas pesadas.

Mientras que la estructura y el reordenamiento de los genes de las cadenas ligeras y pesadas son similares en ciertos aspectos, existe un gran número de diferencias que añaden más interés al sistema de las cadenas pesadas.

La diferenciación del linfocito B conlleva la aparición inicial de cadena  $\mu$  en el citoplasma de una célula pre-B (55) seguida por la aparición de IgM en la superficie (56, 57) y frecuentemente IgD (58). La especificidad e idiotipo de ambas moléculas expresadas sobre la misma célula son idénticos, lo que sugiere que sus regiones V también lo son (59). Además, la maduración del linfocito puede causar la pérdida de la producción de IgD sin alterar la producción de IgM y, a menudo, la de una nueva clase de inmunoglobulina. Su desarrollo puede conducir a una eventual pérdida de la producción de IgM, dedicándose la célula a la producción exclusiva de cual-

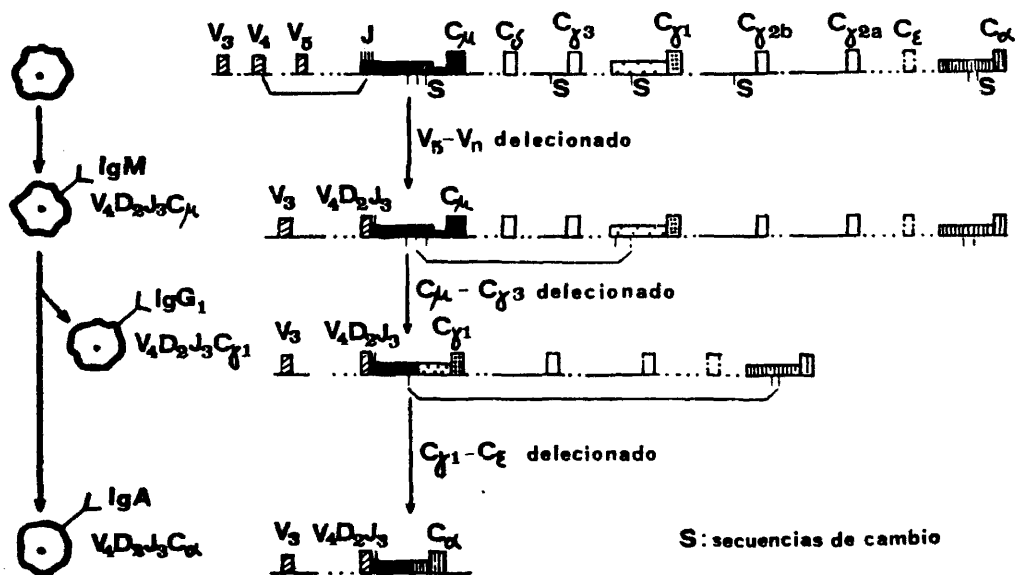
quiera de las clases (M secretada, G, A o E). Este proceso -- que permite el cambio del componente de la región constante -- de la cadena pesada mientras se mantiene la misma región V recibe el nombre de Cambio de clases de las cadenas pesadas.

Por tanto, cualquier modelo que trate de explicar -- la organización y expresión de los genes de las cadenas pesadas -- necesariamente ha de dar cuenta de este fenómeno.

La producción simultánea de IgM e IgD puede explicarse sin necesidad de recurrir a reordenamientos del DNA. En estudios recientes de clonaje (60) se ha establecido la posición relativa de los genes de las cadenas pesadas  $\lambda$  y  $\delta$ , los cuales se encuentran contiguos en la dirección 5'/3' y separados por aproximadamente 2,5 kilobases. La proximidad de estos genes, su orientación, el hecho de que ambas cadenas pesadas/ esten asociadas con la misma región V y el hecho de que un -- splicing alternativo parece explicar la expresión simultánea/ de cadenas  $\mu$  de membrana y secretada indujeron a sugerir que las cadenas  $\mu$  y  $\delta$  provienen de un procesamiento diferencial -- de un RNA precursor.

Sin embargo, para el resto de la fenomenología no -- se ha encontrado aún una explicación satisfactoria. A pesar -- de la existencia de varios modelos: Inserción secuencial (61), inserción múltiple (62) y postranscripcional (63, 64), solamente el modelo de la delección alélica (65, 66, Figura 5) parece dar cuenta de los dos tipos de recombinación somática actualmente admitidos como necesarios (44) para la generación -- de los genes completos de las cadenas pesadas. Evidencia experimental de las delecciones previstas en el modelo han sido -- también descritas (67, 68).

El mecanismo por el que se produce el segundo tipo/ de recombinación (sustitución del exón codificante para la re



**Figura 5.-** Modelo de delección alélica que explica el cambio de las cadenas pesadas.



gi3n constante  $\mu$  por otro codificante para otra clase) no est3 aclarado, ya que esto parece necesitar una gran variedad - de sitios de recombinaci3n situados en los intrones que flanquean cada uno de los genes. El descubrimiento de secuencias/ repetitivas (69) o espec3ficas para cada gen (44) en estos in trones no hace m3s que destacar la extrema variabilidad de -- los sitios de cambio. Si a ello a3adimos la ausencia de se--- cuencias complementarias como las descritas en la recombina-- ci3n V/D/J, queda claro que los sistemas enzim3ticos que dan/ cuenta de ambos procesos deben ser diferentes.

La validez general de este modelo ha sido reciente-- mente cuestionada por los mismos autores, ya que el modelo de delec3n original predec3a que el cambio s3lo pod3a transcu-- rrir en el mismo orden de los genes en la l3nea germinal,  $\mu$ ,  $\delta$ , Y3, Y1, Y2b, Y2a,  $\alpha$  (70, 71, 72). La descripci3n de casos en/ los que se observa un orden inverso en el cambio (73) pueden ser explicados, dentro del contexto del modelo, por un siste-- ma de delec3n que involucra un sobrecruzamiento desigual en-- tre las crom3tidas hermanas (72).

La Figura 6 muestra un esquema-resumen de los meca-- nismos que gobiernan la expresi3n del repertorio, aunque en - el resumen expuesto no se haya mencionado el control a nivel/ de la expresi3n postreceptor.

## EXPRESION

prereceptor

postreceptor

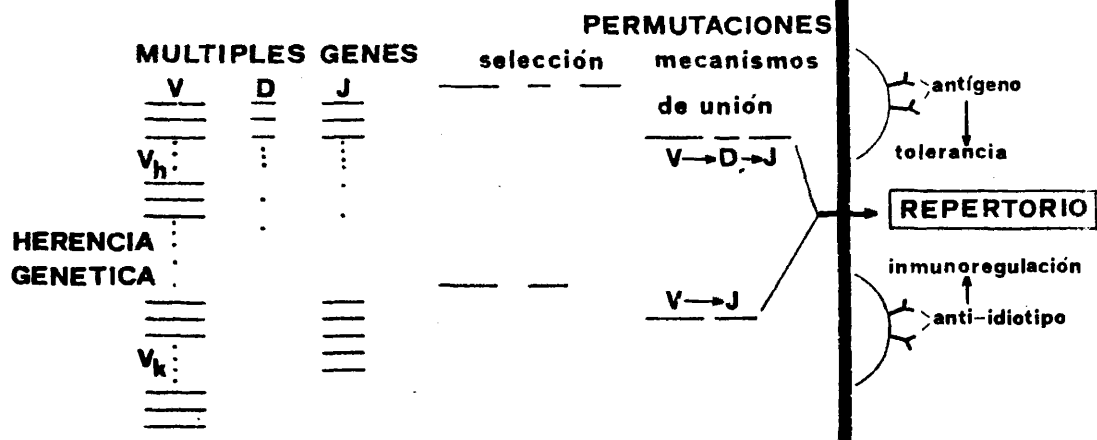


Figura 6.- Mecanismos que gobiernan la expresión del repertorio.

## 1.2. FLEXIBILIDAD

La movilidad conformacional es una propiedad general de las proteínas en disolución, pero muy pocas exhiben flexibilidad segmental (74). Este tipo de flexibilidad molecular - facilita la transducción de señales desde los sitios combinantes a los sitios efectores de los anticuerpos (75, 76) y juega un papel importante en su capacidad para establecer uniones multivalentes con ciertos antígenos tales como los presentes en virus, bacterias y superficies celulares. La importancia radica en que las múltiples interacciones provocan un aumento de la avidéz intrínseca lo que a su vez aumenta la eficiencia de la reacción inmune.

La flexibilidad segmental dentro de la molécula de IgG que permite a las regiones Fab adoptar una variedad de orientaciones espaciales con respecto al Fc (80) así como variar la distancia entre los sitios combinantes del anticuerpo situados en los extremos distales de los Fab están mediados por la región gozne.

La región gozne de la IgG, compuesta de unos 15 residuos que unen las regiones de homología C<sub>γ</sub>1 y C<sub>γ</sub>2 en cada una de las cadenas pesadas, presenta una estructura lineal, es muy susceptible a la ruptura proteolítica y juega un importante papel estructural dentro de la molécula de anticuerpo. Así, los puentes disulfuro intercatenarios que unen las cadenas H están localizados en esta región y sirven para mantener una rígida relación espacial entre los dos dominios C<sub>γ</sub>2 que no muestran asociación no covalente significativa (77, 78). Además, esta región que es codificada por un exón diferente (79) actúa como un espaciador minimizando la población de estados conformacionales en los que se alcanza una asociación entre la regiones Fab y Fc.

Evidencia para la existencia de flexibilidad segmental nace de las micrográficas electrónicas obtenidas con anticuerpos en combinación con haptenos divalentes (81). En estos complejos los brazos Fab se extendían en ángulos aparentes de 0 a 180° uno con respecto del otro. Ya que las regiones Fab son rígidas y compactas (80) ese amplio margen de variabilidad debe provenir de alguna flexibilidad en la región gozne - que posee una estructura relativamente abierta (82). Sin embargo, la probable distorsión inducida por la combinación con el hapteno así como la representación bidimensional de una estructura tridimensional limitan la posibilidad de obtener medidas cuantitativas del grado de flexibilidad inherente a estas moléculas.

Posteriormente medidas de despolarización de la fluorescencia, dependiente del tiempo (83, 84), así como estudios de transferencia de energía entre los sitios combinantes (85, 86) confirmaron los movimientos relativos entre los fragmentos -- Fab y Fc aunque los estudios encaminados a definir la forma completa de la IgG en solución dejan algún margen a la especulación, ya que es probable que la unión del antígeno pueda favorecer una conformación del anticuerpo que sea termodinámicamente estable pero que no esté especialmente favorecida en el anticuerpo libre en solución (87).

Es obvia la importancia de los datos que se pueden obtener como consecuencia de la reducción de los puentes disulfuro intercadena pesada de la IgG. Es conocido que esta reducción interfiere con su capacidad de activación de complemento (88, 89), capacidad de aglutinación (90) y con su unión a receptores celulares (91, 92) aunque no afecta a su reacción con el factor reumatoide (93). Aunque determinados análisis han sido incapaces de detectar cambios conformacionales -

consecuentes a la reducción de la IgG (94,96,97,98), estudios de depolarización de la fluorescencia (95) proporcionan evidencia directa de que los puentes disulfuro intercatenarios restringen la flexibilidad en la molécula nativa; este hecho queda indirectamente confirmado por los experimentos de aglutinación realizados por Romans y col. (90).

En estos estudios anticuerpos IgG incompletos con especificidad para antígenos eritrocitarios se convierten en aglutininas directas, tanto en fase soluble como en complejos, por reducción suave. Este hecho puede explicarse si se considera que tras la reducción debe lograrse suficiente libertad/ como para permitir una conformación extendida en las regiones inter  $C_{\gamma}2$ - $C_{\gamma}3$  dando lugar a la aparición de un nuevo gozne en las mencionadas regiones (90, 98). Esto es posible porque los dominios  $C_{\gamma}3$  se mantienen fuertemente asociados mediante interacciones no covalentes (78) mientras que los dominios  $C_{\gamma}2$  no exhiben ninguna interacción lateral significativa. Como consecuencia de ello se altera la relación geométrica existente entre estos últimos dominios y la expresión de algunas funciones biológicas (99).

Actualmente la función biológica de la región gozne permanece sin esclarecer; sin embargo, la singularidad de su estructura, su aparente evolución independiente y su conservatividad filogenética apuntan a la importancia de su existencia. Aunque ciertos autores consideran a esta región como un dominio degenerado y colapsado (100), la limitación en la expresión de funciones efectoras por inmunoglobulinas patológicas carentes de ella es una prueba de la significación funcional de esta región (101, 102). El limitado grado de flexibilidad segmental observado en estas proteínas patológicas, como consecuencia de la fuerte asociación entre las regiones Fab y

Fc, implica a estos dominios como recíprocos limitadores de su flexibilidad intrínseca, además de contribuir junto con el gozne a la restricción de la flexibilidad total de la molécula de IgG. Preponderancia en la modulación por parte del Fc (103) o de los Fab (104) queda aún por esclarecer.

### 1.3. MULTIFUNCIONALIDAD

Los anticuerpos se han revelado como uno de los efectores macromoleculares de funcionalidad más diversa en la naturaleza. Sin embargo, aún teniendo presente la abundante literatura sobre el tema, se sabe muy poco acerca de los mecanismos moleculares que median sus funciones biológicas. No obstante es bien conocido que los sitios efectores residen en la región constante y particularmente en la región Fc de la molécula.

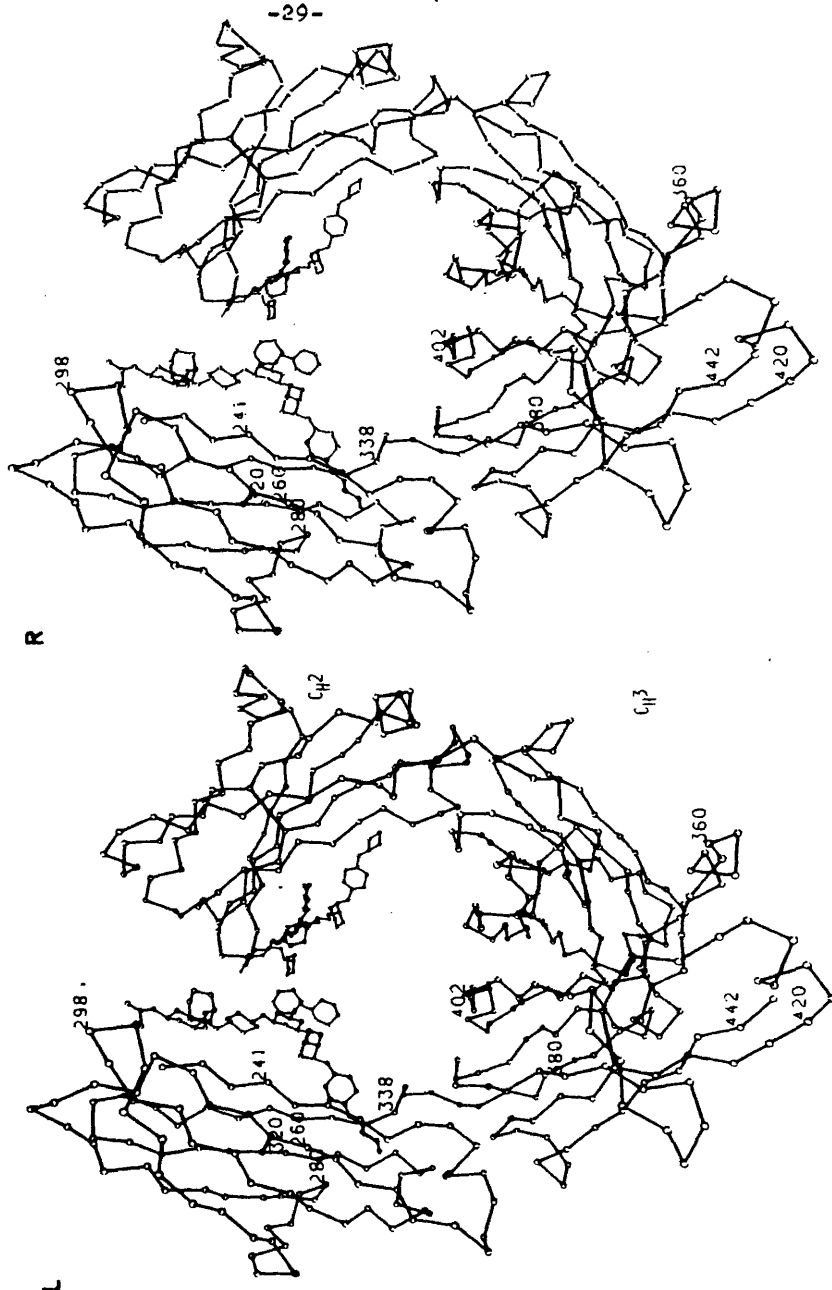
#### 1.3.1. Estructura del fragmento Fc.

El fragmento Fc de la inmunoglobulina G humana,  $Fc_\gamma$ , comprende la región COOH-terminal de las cadenas pesadas, entre los residuos 223 (Thr) y 446 (Gly) para la IgG1 (105). Es un dímero unido covalentemente mediante puentes disulfuro en su extremo  $NH_2$ -terminal y por numerosas fuerzas no covalentes en su región COOH-terminal. Cada una de las cadenas polipeptídicas que componen el fragmento está plegada en dos dominios globulares, denominados  $C_{\gamma}2$  y  $C_{\gamma}3$ .

La estructura cristalina del fragmento  $Fc_\gamma$  se ha determinado a  $4 \text{ \AA}$  (106) y a  $3.5 \text{ \AA}$  (78) de resolución. Estos datos, junto con los más detallados obtenidos recientemente --- (107, Figura 7) a partir del refinamiento a  $2.9 \text{ \AA}$  configuran las líneas generales de lo que a continuación se resume.

- Cada uno de los dominios  $C_{\gamma}2$  y  $C_{\gamma}3$  está plegado en dos capas de estructura en hoja  $\beta$ -antiparalela que engloban un interior predominantemente hidrofóbico incluido el puente disulfuro intracatenario que las une, típicas de todos los dominios de las inmunoglobulinas. Ambos dominios están conectados por un segmento que se extiende desde Ser 337 hasta Glu 342 y que es relativamente susceptible a la rotura proteo

-29-



**Figura 7.-** Esquema tridimensional de las posiciones de los C $\alpha$  y los centros de unidades de -hexosa del fragmento Fc $\gamma$ 1.



lítica (108).

- Los dominios  $C_H3$  presentan una fuerte interacción lateral de naturaleza similar a la descrita para los dímeros  $C_H1-C_L$  en el fragmento Fcb (109, 110, 111, 82).

- Los dominios  $C_H2$  no contactan directamente entre/sí, sino que lo hacen, de forma débil, a través del azúcar - que parcialmente lo recubre.

#### 1.3.1.1. El dominio $C_H2$ y el carbohidrato.

No se ha podido interpretar la densidad electrónica correspondiente al segmento Thr 223 - Gly 237, que incluye la totalidad de la región gozne y los puentes disulfuro intercadena pesadas, ya que es una zona prácticamente sin contactos.

La capa 1, que es equivalente a la cara C de contacto en los dominios  $C_L$ ,  $C_H1$  y  $C_H3$  está constituida por cuatro/bandas: Ser 239 a Phe 243, Thr 256 a Val 264, Lys 290 a Tyr - 296 y Thr 299 a Leu 309. La capa 2 consta de tres bandas largas: Lys 274 a Val 279, Glu 318 a Asn 325 e Ile 332 a Ile 336 y una corta que comprende los residuos Val 282 a Val 284 (Figura 8).

El carbohidrato, constituido por 12 unidades de hexosa, de las cuales 9 han sido interpretadas en el modelo refinado, se une a la Asn 297 situada entre las bandas 3 y 4 de la capa 1.

El contacto no covalente del carbohidrato con el dominio  $C_H2$  involucra 14 residuos polares e hidrofóbicos del dominio, esencialmente de las bandas 1 y 2 de la cara C, de los cuales 6 están dentro de la distancia posible de formación de puentes de hidrógeno con átomos suyos. Con alguna excepción, todos los residuos del  $C_H2$  implicados en este contacto están en análoga posición estructural que los del dominio  $C_H3$  involucrados en el contacto interdominio  $C_H3-C_H3$ . Esto sugiere --



que el azúcar, en el  $C_H2$ , proporciona un sustituto para el -- contacto interdominio y presumiblemente ayuda a estabilizar -- la estructura de esta región.

Es interesante examinar las causas por las que el -- dominio  $C_H2$  no puede agregar. Mientras que estudios de homología de secuencias sugieren una estrecha relación con los --- otros dominios constantes y sólo una relación distante con -- los dominios V, la comparación tridimensional establece una -- estructura intermedia (presenta las asas características de -- los dominios V y C, relacionados con la agregación, pero en -- menor tamaño). Si a ello añadimos que el azúcar está especial-- mente fijado y que algunos de los residuos hidrofóbicos, res-- ponsables de la interacción lateral entre los dominios  $C_H3$ , -- están reemplazados por grupos polares en el  $C_H2$ , la formación del contacto parece imposible.

Sin embargo, resulta curioso observar que la  $\beta_2$ -microglobulina, representante de los dominios libres en solu--- ción, presenta, a nivel secuencial, mayor homología con los -- dominios  $C_H3$  que con los  $C_H2$  (112).

#### 1.3.1.2. El dominio $C_H3$ y los contactos $C_H3-C_H3$ y $C_H2-C_H3$ .

Cuatro bandas de hoja  $\beta$ -antiparalela forman la cara de contacto: Glu 342 a Leu 351, Glu 362 a Tyr 373, Asn 390 a/ Leu 398 y Ser 403 a Asp 413, estando severamente distorsionada la geometría de la hoja  $\beta$  en los residuos de Pro 343, 346, -- 395 y 396. En la segunda cara las hojas  $\beta$  están formadas por/ los residuos Ile 377 a Glu 382, Val 422 a His 429, Tyr 436 a/ Leu 443. De la misma manera que en el dominio  $C_H2$ , un cuarto/ segmento corto aparece formado por los residuos comprendidos/ entre Gln 386 y Glu 388 (Figura 9). En el extremo C-terminal/ los residuos 444 a 446 quedan sin definir.

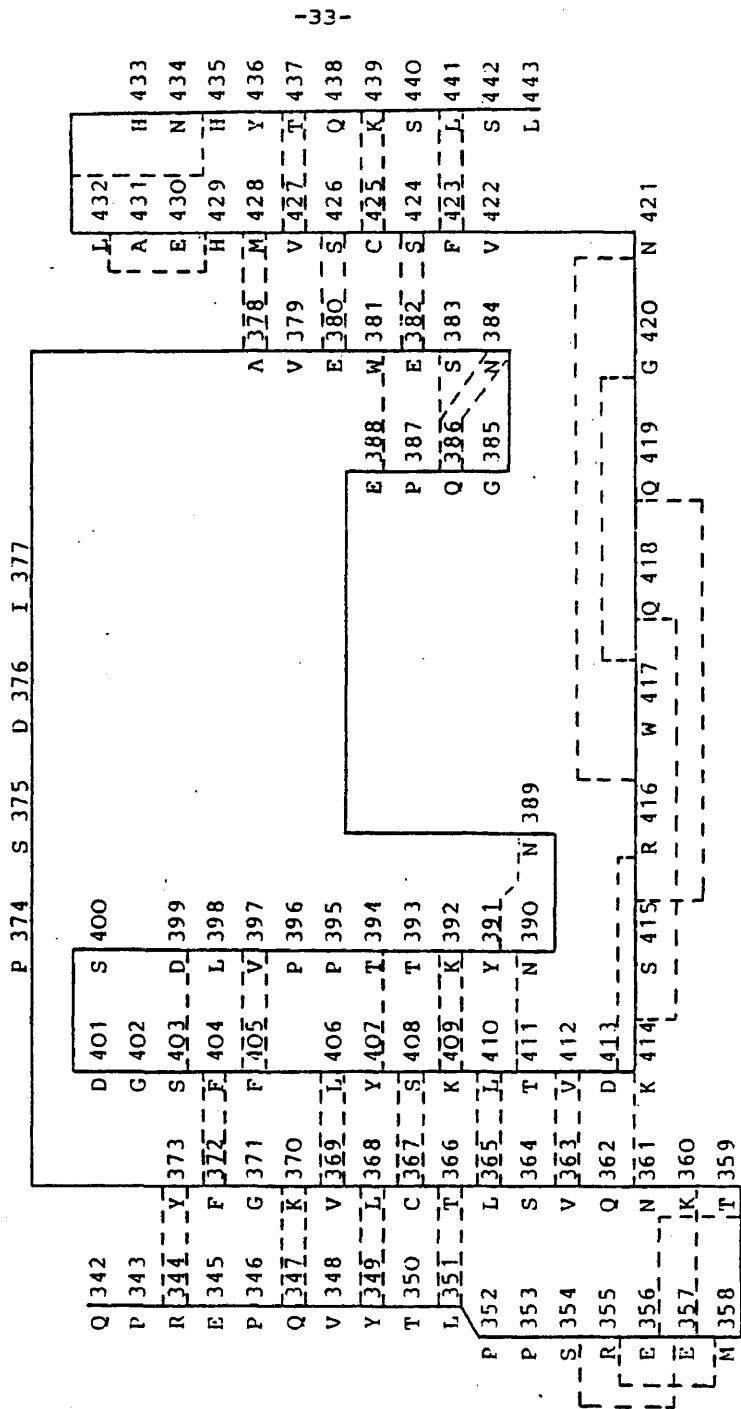


Figura 9.- Cadena principal de puentes de hidrógeno del dominio C<sub>γ</sub>3.

Al contacto  $C_H3-C_H3$  contribuyen 27 residuos de cada dominio, la mayoría de los cuales están en posiciones homólogas a las que participan en el contacto  $C_H1-C_L$  en el Fab (82, 113).

El contacto  $C_H2-C_H3$  tiene 1/3 del tamaño del contacto  $C_H3-C_H3$ , definido en términos de disminución de la superficie accesible. Los segmentos que los median son homólogos de los existentes entre V y C en el Fab. Las diferencias entre las simetrías locales entre ambos dominios reflejan cierta -- flexibilidad en esta región.

Es de notar la conservatividad de Leu 251 como el -- residuo hidrofóbico más importante del contacto  $C_H2-C_H3$  (114). Este residuo aparece conservado en la IgG humana, de ratón, -- cobaya y conejo; en la IgA humana y en el dominio  $C_H3$  de la -- IgE. En el dominio  $C_H3$  de la IgM el residuo homólogo es Ile; -- ello añade evidencia a que el dominio constante  $C_H3$  de la IgM e IgE se parecen al  $C_H2$  del  $Fc\gamma$ . Otros residuos implicados en este contacto que están altamente conservados son: Pro 247, -- Met 252, Lys 338, Pro 374 Asp 376, Ile 377 y Glu 430. Asimismo el puente salino entre Lys 338 y Glu 430 parece jugar un -- importante papel en este contacto, como lo sugiere su gran -- conservatividad.

#### 1.3.2. Funciones efectoras.

Además de la unión del antígeno, denominada función primaria, los anticuerpos realizan una serie de funciones biológicas conocidas genericamente con el nombre de "Funciones -- efectoras". Desde una perspectiva evolutiva la función de reconocimiento antecede filogenéticamente al resto de las funciones exhibidas por las moléculas de anticuerpo (115).

Estas funciones (Tabla 1) juegan dos tipos de pape

TABLA I

---

PROPIEDADES EFECTORAS DEL FRAGMENTO Fc<sub>γ</sub> HUMANO

---

Propiedades Dependientes de Antígeno

- Fijación de Complemento (Vía Clásica)
- Actividad Opsónica (Neutrófilos, Monocitos)

Propiedades Independientes de Antígeno

- Unión a Superficies Celulares
    - Macrófagos
    - Linfocitos
    - Neutrófilos
    - Células K
  - Regulación del paso a través de membranas
    - Placenta
    - Epitelio Intestinal
  - Regulación del Catabolismo
  - Anafilaxis Cutánea Pasiva
  - Interacción con la Proteína A del S. Aureus
  - Interacción con Factores Reumatoides
-

les fundamentales.

- a) Independientemente de la unión del antígeno, la función efectora puede posibilitar la presencia del anticuerpo en una localización particular para proporcionar un encuentro posterior con el posible antígeno.
- b) Tras la unión del antígeno la función efectora - amplifica las consecuencias fisiológicas de la unión que, generalmente, conducirán a la eliminación de éste.

Desde que Porter (116) demostró que la molécula de anticuerpo podía escindirse en dos fragmentos funcionalmente activos, Fab y Fc, han sido muchos los intentos encaminados a identificar fragmentos de menor tamaño que dieran cuenta de las funciones expresadas por el conjunto de la molécula.

La "hipótesis de los dominios" (105), que postula que cada función exhibida por la molécula puede ser más precisamente localizada en cada una de las regiones de homología características de las inmunoglobulinas, ha sido ampliamente corroborada en el caso de la unión al antígeno y activación del complemento por la vía clásica. Sin embargo, no ocurre lo mismo con otras funciones a las que, como veremos más adelante, es imposible actualmente asignarlas a uno de los dominios  $C_H2$  o  $C_H3$ .

Como la experimentación, en general, se lleva a cabo utilizando fragmentos que engloban uno o varios dominios, la incapacidad funcional mostrada por un determinado fragmento puede no ser representativa de la situación en la molécula completa. La auténtica razón de esta incapacidad podría radicar, en algunos casos, en los cambios conformacionales que hayan afectado al sitio efector, como consecuencia de su separa

ción de la molécula completa.

#### 1.3.2.1. Activación de complemento (Vía Clásica).

La iniciación de esta ruta tiene lugar como consecuencia de la unión de Clq, uno de los tres subcomponentes -- del primer componente de este sistema, a complejos antígeno-- anticuerpo o a agregados inespecíficos de inmunoglobulina -- (Clq también se une a inmunoglobulina monomérica aunque con -- mucha menos afinidad (117)). Como consecuencia de esta unión/ se produce una alteración en el Clq (122, 123, 124) que permi te la estabilización del complejo  $\text{Clr}_2\text{-Ca}^{2+}\text{-Cls}_2$  a la vez que la autoactivación de sus subcomponentes, de manera que el Cls activado, que tiene actividad peptidasa, actúa sobre C4 prime ro y sobre C2 después determinando la formación de un comple-- jo enzimático, la C3-convertasa ( $\text{C42}$ ), con especificidad úni ca para C3, el cual resulta escindido. Uno de los fragmentos, el C3b, se queda unido al  $\text{C42}$  formando otro complejo molecu-- lar, el  $\text{C423}$ , con actividad enzimática sobre C5 por lo que re-- cibe el nombre de C5 convertasa. La acción del complejo so-- bre C5 produce un fragmento, el C5b, que junto con el resto -- de los componentes del complemento C6, C7, C8 y C9 forman lo/ que se denomina unidad de ataque a la membrana o complejo líf-- tico, cuya acción conduce a la ruptura de la membrana celular sobre la que se ha ubicado.

En la Figura 10 se esquematiza este proceso, apare-- ciendo señalado aquellos fragmentos polipeptídicos que como -- consecuencia de la activación de ciertos componentes son libe-- rados y poseen actividad biológica propia.

##### 1.3.2.1.1. Estructura del Clq.

El Clq es una proteína con peso molecular de 400000



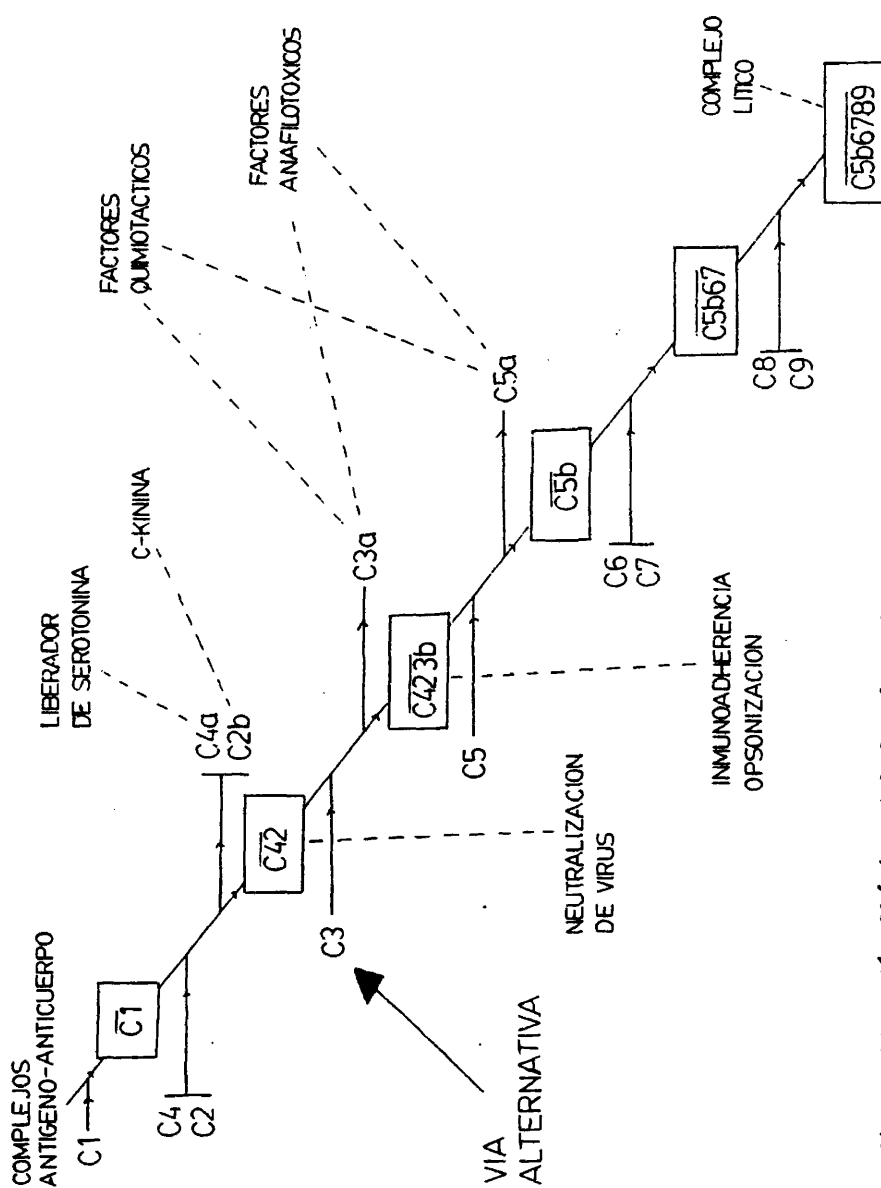


Figura 10.- Vía Clásica del Complemento.

Dalton formada por 18 cadenas peptídicas, 6A, 6B y 6C, cada una de las cuales tiene alrededor de 200 amino ácidos y un contenido en azúcar de 12, 8 y 4% respectivamente (121).

Los análisis de aminoácidos de las tres cadenas mostraron un elevado contenido en glicocola (18%) así como en hidroxilisina (2%) e hidroxiprolina (5%), no habiéndose detectado estos dos últimos aminoácidos en otras proteínas séricas. Estos resultados, junto con la presencia mayoritaria de hexosas neutras en el azúcar, eran semejantes a los encontrados en colágeno y proteínas de membrana basal y sugerían la presencia de estructuras colagénicas dentro del Clq.

Los estudios de secuencia (122) confirmaron estos datos y mostraron que las tres cadenas son muy similares, teniendo cada una de ellas alrededor de 80 residuos de secuencias tipo colágeno cerca de su extremo N-terminal.

La secuencia N-terminal de la cadena B, entre los residuos 6 y 89, tiene un triplete repetido Gly-X-Y donde X es a menudo prolina e Y hidroxiprolina o hidroxilisina. Las cadenas A y C tienen secuencias similares entre los residuos 9-89 y 3-89 respectivamente. A excepción de pequeños cambios, hay una secuencia continua en las tres cadenas cuya similitud con el colágeno se ratifica por la presencia del disacárido galactósido del glucosa como sustituyente en el 82% de los residuos de hidroxilisina (123). Las secuencias de los restantes 110 residuos C-terminales, no colagénicos presentan una homología superior para las tres cadenas e incluyen en cada una un puente disulfuro intracatenario.

El Clq cuando se reduce y somete a electroforesis en gel de poliacrilamida, en presencia de SDS, muestra las tres bandas correspondientes a las cadenas A, B y C, en iguales cantidades. Si se omite la reducción sólo se distinguen

dos bandas correspondientes a dos subunidades de peso molecular 46000 y 48000 Dalton. La subunidad aparentemente mayor contiene un dímero de las cadenas A y B, mientras que la menor es un dímero de cadenas C. Los rendimientos relativos sugieren una relación de 6 dímeros A-B por 3 dímeros C-C (124).

Los estudios de microscopía electrónica (125) -- muestran que la molécula está compuesta de 6 regiones globulares periféricas, de sección circular, que están unidas -- por una banda conectante a una porción central de naturaleza aparentemente fibrilar y de forma aproximadamente rectangular. Cuando las preparaciones de Clq son tratadas con pepsina, las micrograffas sugieren que las porciones globulares periféricas han sido digeridas. Sin embargo, cuando la molécula es digerida con colagenasa, solamente se visualizan fragmentos que corresponden a las regiones periféricas/individuales o agregadas.

Evidencia más directa para la presencia de estructura en triple hélice en el Clq viene de los estudios de dicroismo circular de la molécula intacta y del fragmento obtenido de la digestión con pepsina (125). La aparición en la molécula nativa de una banda de elipticidad positiva a 230 nm es una buena indicación de la presencia de estructura colagénica, aunque su pequeña magnitud y su relativamente alto desplazamiento respecto a la banda característica (220 nm) sólo pueden explicarse si se admite una cierta contribución de hélice  $\alpha$  o estructura  $\beta$ . Este dato es consis--tente con el hecho de que la banda antes mencionada se desplace a 223 nm cuando se realiza el espectro del fragmento/pepsínico. La desaparición de ambas bandas (230 y 223 nm) -- como consecuencia del tratamiento con colagenasa confirma --

la presencia de estructura colagénica en la molécula nativa.

Tanto el Clq nativo como su fragmento pepsínico - muestran una temperatura de fusión que es 10°C superior a - la del colágeno. Se ha postulado que la agregación de las - triples hélices es la causante de esta propiedad ya que se/ sabe que la agregación de moléculas de colágeno produce un/ efecto estabilizante contra la desnaturalización térmica -- (126).

Estos resultados son coherentes con el modelo es- quematizado en la Figura 11. En él las 18 cadenas están --- asociadas a través de sus regiones tipo colágeno para dar una estructura hexamérica que recuerda a un ramillete de tulipa- nes. Los recientes datos de dispersión de bajo ángulo de -- neutrones confirman estos datos así como una estructura úni- ca y abierta (127).

#### 1.3.2.1.2. La unión anticuerpo-Clq.

Las regiones globulares periféricas del Clq con-- tienen los sitios de unión para la región Fc de los anti--- cuerpos (128). También es sabido que las estructuras del an- ticuerpo responsables de la unión de la unión radican en el dominio C<sub>H</sub>2 de la IgG (129) ya que esta región se muestra - tan eficiente, en base molar, como la molécula completa o - el Fc en su capacidad de activación del complemento por la/ vía clásica. Sin embargo, no existe ningún modelo convincent- te que defina la topografía precisa y la naturaleza química de los centros efectores.

Dada la complejidad aparente del sistema, se han/ ensayado varias aproximaciones en un intento de definir es- tructuralmente el sitio efector del C<sub>H</sub>2.

Los análisis cristalográficos de inmunoglobulinas/

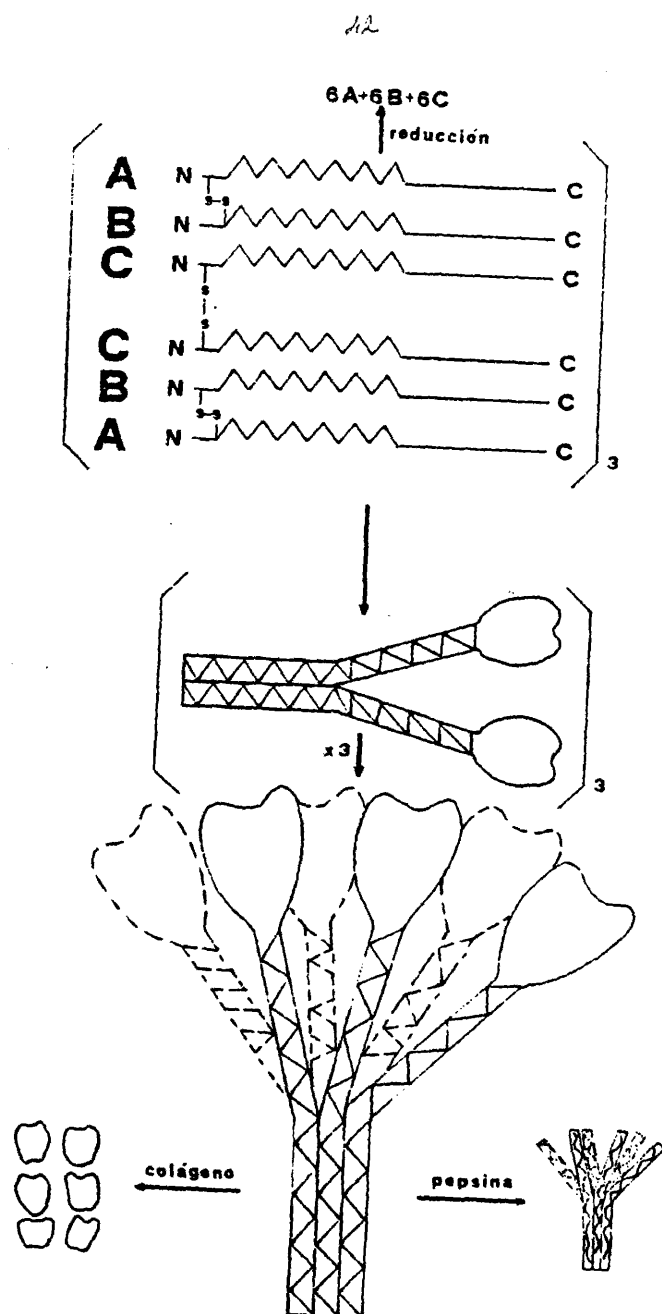


Figura 11.- Modelo de la molécula de Clq.

han sido incapaces de proporcionar una clara relación estructura-función (78, 107, 130). Análisis comparativos de secuencia de aminoácidos de inmunoglobulinas que difieren en su capacidad de activar complemento sugieren la participación de un segmento lineal del  $C_H2$  que se extiende desde Lys 290 a Gln 295 (131). Sin embargo, un análisis predictivo que combina los datos cristalográficos, las secuencias de aminoácidos y la modificación química, apunta hacia las dos bandas  $\beta$  C-terminales del dominio  $C_H2$ , Gly 316-Lys 340, como un posible sitio de unión (132).

La naturaleza de los residuos implicados es, asimismo, desconocida. Se ha sugerido la participación de cadenas laterales iónicas por la capacidad de una amplia variedad de sustancias de carácter iónico de unir Clq o inhibir/la interacción IgG-Clq (133-137). El efecto inhibitorio es, normalmente, mayor para aquellos compuestos iónicos que además son de naturaleza aromática. Alguno de ellos, como el 1-anilinaftalen-8-sulfonato de magnesio, el 2,5-diaminotolueno o la menadiona se unen específicamente a la porción N-terminal del dominio  $C_H2$  y se comportan como inhibidores/competitivos de la unión de Clq (138). Además, se conoce la capacidad de los polianiones de activar la vía clásica del complemento (139) así como la de los complejos polianión-polianión de unir Clq (140).

La modificación química de 1 ó 2 residuos de Trp/ expuestos al solvente (141) del fragmento Fc produce la pérdida total de capacidad fijadora de complemento, sin apenas alterar la unión de Clq (142, 143); la capacidad de activación de complemento también se afecta cuando se modifican los restos de Lys (144, 145) o los grupos ácidos (146) del Fc.

Estudios de inhibición, utilizando pequeños péptidos sintéticos, sugieren que tanto grupos iónicos como residuos apolares en la proximidad del Trp 277 pueden contribuir al sitio de unión (147, 148). Niveles semejantes de inhibición se han conseguido con el péptido Ile 253-Leu 306 - (149) y con un péptido de alrededor de 60 residuos perteneciente también al dominio C<sub>H</sub>2 (150).

La mayoría de estos trabajos apoyan la posibilidad de que el Trp 277 esté implicado, si no directamente, - si al menos como elemento estabilizador del estado conformacional del sitio de unión, que probablemente involucra residuos de diferentes regiones del C<sub>H</sub>2.

Sin embargo, existen datos que sugieren que la expresión de la capacidad de unir Clq por el dominio C<sub>H</sub>2 parece ser independiente de la conformación de este dominio. -- Inicialmente Isenman y col. (89) demostraron que la  $\beta_2$ -microglobulina que fija complemento en estado nativo también/ lo hace en forma desplegada previa reducción del puente disulfuro intracatenario que ocasiona la pérdida de su estructura típica para pasar a cadena estadística. Además, péptidos sintéticos mimetizadores de la secuencia alrededor del/ Trp 277, sin presumible estructura secundaria, exhiben cierta actividad anticomplementaria (147).

#### 1.3.2.2. Unión a receptores celulares.

##### 1.3.2.2.1. Unión a linfocitos.

Se han detectado receptores con afinidad para las inmunoglobulinas en linfocitos de diferentes especies animales (151). Estudios en subpoblaciones, han demostrado que - linfocitos T (152-156) y B (157, 158) tienen receptores pa-

ra IgG. Similarmente se han descrito receptores para otros/isotipos. Así, se han detectado receptores para IgM en linfocitos T normales y leucémicos (159-162) y en linfocitos B normales y neoplásicos (163). Recientemente se han detectado receptores para IgA, IgE e IgD en varias fracciones de linfocitos (164-167).

En todos los casos la interacción se media a través de la región Fc de la correspondiente inmunoglobulina, aunque la porción específica implicada no está claramente definida. En particular no hay evidencia convincente que permita asignar el sitio de unión a  $C_H2$ , a  $C_H3$  o a la combinación de ambos (92, 102, 168, 169 y 170).

No se conoce el papel que juega la unión de la inmunoglobulina al receptor, aunque se piensa que puede estar implicado en procesos de regulación de la respuesta inmune. El hecho de que células T humanas, en condiciones apropiadas in vitro, puedan expresar subsecuentemente diferentes receptores para Fc sugiere que células con diferente fenotipo en su receptor no son más que una expresión de su diferente estado de activación (171).

Recientemente se ha aislado un receptor para Fc, en linfocitos B con actividad fosfolipasa  $A_2$  (172, 173, 174).

#### 1.3.2.2.2. Unión a monocitos y macrófagos.

La región Fc de ciertos tipos de inmunoglobulinas es también reconocida por receptores presentes en esta clase de células fagocíticas (175). Estas células expresan un receptor, sensible a proteasas, que une preferentemente las subclases 1 y 3 de la IgG humana (176). El hecho de que se pueda inhibir cruzadamente la unión a la superficie celular sugiere que el receptor no es específico de espe-



cie, de clase ni de subclase (91).

La zona del Fc responsable de la unión al receptor celular no está aún dilucidada. Así, para ciertos autores - (129, 177, 178) el pFC' es la región sobre la que reside la actividad citofílica de la IgG para unirse a estas células. En sus experimentos el dominio  $C_H3$  es tan activo, en base molar, como la IgG o el Fc. Profundizando más, Ciccimarra y col. (179) aislaron un péptido, que abarca los residuos 407 a 416 al que le asignan como región responsable de la interacción. Sin embargo, otros autores (180, 181, 182) implican necesariamente al dominio  $C_H2$  o al Fc intacto. Recientemente se ha observado una disminución en la capacidad de unión de la IgG reducida a su receptor (102, 183), lo que apunta/hacia esta última posibilidad.

La unión con el receptor transcurre con una constante de afinidad que es función de la especie y de si el anticuerpo se une en forma monomérica o formando complejos/ con el antígeno correspondiente. Los valores oscilan entre/  $10^6-10^7 M^{-1}$ . El número de receptores por célula varia entre  $10^5$  y  $10^6$  (184, 185, 186).

No está claro el mecanismo por el que el anticuerpo media la endocitosis del antígeno pero parece ser que la reticulación de los receptores, como consecuencia de la --- agregación del anticuerpo por su antígeno, provoca una alteración en la membrana que conduce a la fagocitosis del complejo por un mecanismo que requiere energía (187, 188).

#### 1.3.2.2.3. Unión a mastocitos y basófilos.

La IgE es capaz de unirse, en ausencia de antígeno, a los receptores presentes en este tipo de células. Las constantes de unión para la interacción oscilan entre  $10^8$  --

$10^9 \text{ M}^{-1}$  (189, 190, 191).

Ya que el fragmento  $\text{Fc}_\epsilon$  es capaz de bloquear la sensibilización pasiva de la piel (192), se asigna a esta región la propiedad de mediar la unión con los receptores. Sin embargo, ensayos encaminados a localizar el sitio citofílico dentro de esta región han resultado infructuosos. El hecho de que los receptores no unan IgE que haya sido reducida o calentada a  $56^\circ\text{C}$  (193, 194) apunta a una posible implicación de los dominios  $\text{C}_{\text{H}3}$ - $\text{C}_{\text{H}4}$ .

Minta y Painter (195), en un ensayo de anafilaxis cutánea pasiva, mostraron que esta reacción era inhibida cuando se administraba el dominio  $\text{C}_{\text{H}3}$  de la IgG1 humana junto con el anticuerpo sensibilizante. Estos resultados no coinciden con los sugeridos por otros autores (196, 197, 198). Ovary y col. (181) postulan que es el Fc intacto la región necesaria para expresar esta función.

El descubrimiento de que anticuerpos dirigidos contra el receptor, o los fragmentos  $\text{F(ab')}_2$  de estos anticuerpos, pueden inducir la liberación de los mediadores presentes en los gránulos de los mastocitos, facultad que no posee el fragmento  $\text{Fab'}$ , sugiere que es el reticulado de los receptores celulares, y no la IgE en sí, el responsable de la liberación de los mediadores (199).

#### 1.3.2.2.4. Unión a neutrófilos.

Messner y Jelinek (200) demostraron en granulocitos la presencia de receptores para IgG. La interacción era mediada por la región Fc. Más tarde (91) se demostró que este fenómeno era dependiente de subclase observándose que, en el caso de la IgG humana, la graduación  $\text{IgG1} > \text{IgG3} > \text{IgG2} > \text{IgG4}$  era la misma que en monocitos. Este dato sugería que las mismas o similares estructuras del Fc estaban involucradas

das en la interacción con todas las células fagocíticas.

Barnett-Foster y col. (201) sugieren que el sitio de unión de la IgG1 es dependiente de la estructura cuaternaria completa del Fc, ya que ni la IgG o Fc reducidos ni el pFc' son activos en su ensayo de inhibición de rosetas./ La participación del dominio C<sub>H</sub>2 (102) como un principal mediador de la función confirma indirectamente el dato antes mencionado.

El hecho de que tanto las dos subclases de la IgA humana como la IgA secretora tengan capacidad de unión a -- neutrófilos, y que no se haya observado inhibición por parte de la IgG a los receptores indican la existencia de distintos receptores para ambas clases (91).

El mecanismo de la fagocitosis, al igual que en macrofágos, se basa en que la formación de complejos inmunes entre el antígeno y la inmunoglobulina aumenta la avidez del complejo por la superficie celular. Además, la reticulación de estructuras de esta superficie da lugar a la liberación de mediadores y fagocitosis del complejo por un mecanismo que requiere energía.

**1.3.2.2.5. Paso a través de la placenta.**

La transferencia de inmunoglobulinas de la madre/ al hijo, ocurre prenatalmente en el hombre, posnatalmente - en el cerdo y durante ambas fases en el conejo, rata y ratón. El transporte prenatal ocurre a través de las membranas placentarias en el hombre o en las del saco embrionario en la rata y ratón y es específico para la clase IgG (202, / 203). Se desconoce la causa por la que otros isotipos tienen impedido su transporte.

## Estudios cinéticos sobre la especificidad del ---

transporte (204, 205, 206) muestran que en especies donde - hay una transferencia selectiva de IgG, la IgG homóloga es/ transportada preferentemente respecto a la heteróloga, ---- aunque el transporte de esta última también tiene lugar. In cluso dentro del sistema homólogo, parece haber una capta-- ción preferente de los componentes electroforéticamente más lentos respecto a los más rápidos. (207).

El primer paso en el transporte placentario en el hombre, es la unión a un receptor en la membrana sincitio-- trofoblástica. Se han postulado varios modelos para dar --- cuenta del transporte (208-211), pero en todos ellos se evi-- dencia el desconocimiento actual que se tiene respecto a -- los mecanismos que regulan la formación de vesículas en cé-- lulas eucarióticas.

La unión de IgG es específica y saturable con un/ orden de afinidad  $IgG1 > IgG3 > IgG4 > IgG2$ . El Fc muestra las -- mismas características de unión que la IgG (212).

La reducción y alquilación de los puentes disulfu-- ro reduce en gran medida la interacción de la IgG con el -- receptor (212). Este mismo efecto se ha observado con una - IgG carente de la región gozne (213).

Los fragmentos correspondientes a los dominios --  $C_H2$  y  $C_H3$  no se unen por sí solos (212, 213), por lo que - se ha propuesto que la zona de contacto  $C_H2-C_H3$  debe perma-- necer inalterada, involucrando de alguna manera la partici-- pación de los dos dominios.

#### 1.3.2.3. Interacción con la Proteína A del *S. aureus*.

La Proteína A de la pared de *S. aureus* es capaz - de unir la región Fc de la IgG de diferentes especies. La - interacción provoca una reticulación de los Fc y los comple

jos formados pueden unir complemento (314-218). Más recientemente (219) se ha confirmado que la unión del fragmento B, FB, de esta proteína al Fc no interfiere con la unión al Clq.

En el hombre, la reactividad está marcada por una clara especificidad respecto a la subclase, de manera que la IgG3 no se une mientras sí lo hacen las otras tres subclases (220, 221).

Aunque siempre se ha descartado la participación individual de los dominios  $C_H2$  y  $C_H3$  como mediadores de la unión, lo cual indirectamente sugería la necesidad de mantener intacta la interacción  $C_H2$ - $C_H3$ , sólo recientemente y gracias a los estudios cristalográficos se ha demostrado que el sitio de unión está localizado en esa zona de contacto (107, 222). En ellos se muestra que el fragmento B de la Proteína A hace dos tipos de contacto con el fragmento Fc. El mayor de ellos, contacto 1, involucra residuos de los dominios  $C_H2$  y  $C_H3$  del Fc así como las regiones en  $\alpha$ -hélice presentes en el FB. Este contacto es predominantemente hidrofóbico y sólo 4 puentes de hidrógeno entre ambos fragmentos contribuyen a la estabilización del mismo. Al contacto 2 solamente contribuyen residuos del  $C_H3$  así como la segunda hélice del FB. La elevada contribución del ión sulfato, presente en el medio de cristalización, a la estabilización del contacto 2 sugiere que es un contacto del cristal y es poco probable que se de en condiciones fisiológicas.

El hecho de que la IgG3 humana, y su fragmento Fc, no se unan a la Proteína A tiene su explicación según estos datos. Así, se ha encontrado que la His 435, que participa en el contacto 1, está sustituida, en la IgG3, por Arg.

Estudios de modificación química previos (223) mostraron que residuos de Lys y Tyr no estaban implicados en la

reactividad de la IgG. Sin embargo, los estudios cristalográficos señalan a la Tyr 436 como un residuo que participa en el contacto 1. Recientemente se ha descrito un nuevo tipo de interacción de la Proteína A que es mediada por los fragmentos  $F(ab')_2$  de la IgG e IgE humanas (224, 225).

No se conoce la significación biológica de la actividad de la Proteína A y su posible efecto en las relaciones/parásito-huésped. Así, mientras que cepas de *S. aureus*, con un elevado contenido en Proteína A, son fácilmente aglutinadas en suero normal, también se ha observado que esta Proteína tiene un efecto inhibitor sobre las opsoninas termolábiles (226). De la misma manera la competición por IgG por parte de receptores Fc y de la Proteína A no tiene actualmente ninguna explicación, aunque sugiere una configuración similar entre los sitios combinantes de la Proteína A y los receptores Fc para la IgG (227).

Recientemente se ha descrito que la Proteína A potencia la actividad "natural killer" en linfocitos humanos (228). Asimismo, se conoce su papel como activador policlonal de células B (229, 230) aunque en este caso las regiones implicadas son distintas de las descritas para la unión al fragmento Fc (231).

#### 1.3.2.4. Interacción con el factor reumatoide.

La reacción de los factores reumatoides generales con los determinantes antígenicos de las inmunoglobulinas parece representar simplemente la consecuencia accidental o patológica de ciertos atributos estructurales de la región constante de la cadena Y. Esos determinantes están localizados dentro del fragmento Fc tanto de la IgG humana como de conejo (232). Sin embargo, ni los dominios  $C_H3$  (233) ni el fragmento

Factb dan reacción (234), aunque sí la muestra una mezcla de  $\mu$  y  $\lambda$  (235). Estos resultados, junto con los de modificación/química (236), sugieren una posible localización de los determinantes autoantigénicos en la mitad C-terminal del dominio  $C_H2$ , siendo necesaria, al menos, una interacción no covalente entre los dominios  $C_H2$  y  $C_H3$  para mantener la integridad de dichos determinantes. Estos mismos estudios descartan la participación directa de residuos de Lys, pero involucran alguna cadena lateral de restos de Tyr.

Aunque es bien conocida la significación biológica de la interacción de los determinantes autoantigénicos con los factores reumatoides generales, no está ni mucho menos claro que la etiología de la artritis reumatoide sea un proceso estrictamente autoinmune (237). En un estudio reciente (238) se sugiere que el contenido de ácido siólico, al influir en la estructura de la IgG, es importante en la génesis del factor reumatoide. Los mecanismos responsables de la alteración no se conocen, pero se pueden sugerir dos: a) actividad defectuosa de la enzima siólico transferasa; b) actividad neuraminidasa incrementada en los linfocitos B productores de IgG. Este último mecanismo sería compatible con la hipótesis de una etiología viral de esta enfermedad (239), ya que ciertos virus presentes contienen neuraminidasa endógena. Sin embargo, este origen estrictamente microbiológico es también cuestionable (237).

De lo que antecede se desprende que la dificultad básica de interpretar y sintetizar los datos de las estructuras de los anticuerpos involucradas en ciertas funciones efectoras radica en los resultados conflictivos que se obtienen en diferentes sistemas experimentales y en la confusión propor-

cionada por las excepciones a las que están sometidos otros - procesos similares. Esto se debe parcialmente al hecho de que la tecnología requiere de una mayor sofisticación pero principalmente a las interpretaciones de datos derivados de aproximaciones bioquímicas en las que sistemas complejos se han - descompuesto en componentes y a partir de las partes se han - tratado de reconstruir los sistemas.

Las funciones efectoras están basadas en interacciones proteína-proteína de más o menos especificidad pero, sin/ duda, de gran complejidad molecular. Por ello el uso de sub-- fragmentos de inmunoglobulinas puede, en muchos casos, no ser representativo de la realidad fisiológica. Asimismo, el empleo de combinaciones heterólogas en los sistemas experimentales - puede, en ocasiones, ser una fuente de artefactos. Indudablemente cualquier investigación encaminada a dilucidar la estructura de los sitios efectores debe tener en cuenta la complejidad y especificidad de las interacciones implicadas.



56

## 2.- OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.

El hecho de que la región Fc de las inmunoglobulinas establezca el puente estructural entre la especificidad frente al antígeno y los sistemas celulares y multienzimáticos de amplificación hacen de ella un atractivo sustrato para el estudio de las relaciones estructura-función. Si a ello se añade el escaso conocimiento que se posee de los sitios de reconocimiento y unión de los dominios constantes y del modo por el cual son activados, bien en su interacción con otras macromoléculas o como consecuencia de la unión del antígeno a los dominios V, cualquier trabajo, planteado sobre una metodología fehaciente, encaminado a esclarecer alguno de estos problemas queda plenamente justificado.

Hace algún tiempo, se inició en nuestro laboratorio una línea de experimentación encaminada a esclarecer la naturaleza del sitio efector de los anticuerpos para el sistema del complemento. El problema se abordó desde el punto de vista de la modificación química de residuos específicos, y más concretamente de los residuos ácidos. La elección del sistema tenía, a priori, tres ventajas: Primero, la modificación de las cadenas laterales ácidas, al estar éstas habitualmente presentes en el exterior de las superficies proteicas o estableciendo interacciones iónicas de gran importancia en el mantenimiento de la estructura terciaria, podía aportar datos muy valiosos sobre la funcionalidad de la molécula. Segundo, entre los estudios de modificación química llevados a cabo en inmunoglobulinas ninguno de ellos había realizado un estudio paralelo del efecto de la modificación sobre la conformación, estudio éste, por otra parte, obviamente fundamental. Tercero, ya que en el Fc reside la capacidad de activación de la vía clásica del complemento, la interpretación de los datos experimentales es más simple y directa que si se realizara so

bre la molécula de IgG completa.

La importancia de los grupos ácidos del fragmento - Fc en activación del complemento quedó patente (146, 240) en base a que: a) La modificación de unos pocos grupos conduce a una pérdida total de la capacidad de activación; b) Esta pérdida parece ser primariamente debida a la propia modificación y no a cambios conformacionales secundarios.

Sin embargo, la manifiesta potencialidad de esta -- aproximación experimental para tratar de definir la topografía del sitio efector de Clq necesitaba de una mayor profundización en el problema. Es decir, era necesario localizar con exactitud los grupos que habían resultado modificados dentro del Fc, y más concretamente en su dominio C<sub>γ</sub>2, y que presumiblemente estaban de algún modo implicados en la pérdida de -- funcionalidad observada. Este fue uno de nuestros objetivos.

Paralelamente, y aprovechando la experiencia adquirida con la modificación química de los restos ácidos, se trató de estudiar su efecto sobre otras funciones efectoras de los anticuerpos mediadas por el fragmento Fc. De esta manera/ y con lo antes mencionado quedaban conformados los objetivos/ generales de la presente Tesis.

Es de resaltar la importancia del objetivo mencionado en primer lugar. Ya que se iba a tratar de localizar un/ determinado número de restos ácidos dentro de la molécula completa de Fc que habían resultado modificados, los posibles -- cambios de amportamiento que se apreciaran en el resto de las funciones a estudiar podrían, en parte, discutirse en base a/ la porticipación de alguno de los restos identificados, ya -- que en el caso del complemento el sitio de unión del Clq está situado exclusivamente en el dominio C<sub>γ</sub>2. De esta manera la -- aparente desconexión de los objetivos queda soslayada por la/

evidente interrelación que presentan.

La metodología realizada se basa en que es posible/ definir condiciones precisas de reacción para lograr una pérdida selectiva de actividad anticomplementaria. Esta ocurre a 5 minutos de modificación. Sin embargo, a 1 minuto la modificación realizada apenas influye en la capacidad de activación del complemento. Por tanto:

1º.- Se aisló el fragmento Fc a partir de IgG humana en condiciones tales que se conserven totalmente sus características conformacionales y funcionales.

2º.- Se modificaron selectivamente los grupos ácidos con el - ester etílico de la glicocola previa activación con carbodiimidas solubles en agua. La reacción se dejó transcurrir durante 30 minutos.

3º.- Se procedió a la puesta a punto de:

- a) Un sistema de formación e inhibición de rosetas para/ medir la capacidad de interacción del Fc nativo y modificado con los receptores celulares de neutrófilos.
- b) Un sistema de aglutinación para estimar la influencia de la modificación sobre la reacción con el factor -- reumatoide.
- c) Un sistema de cromatografía de afinidad para medir la interacción con la Proteína A del *S. aureus*.

Conocida la diferencia de reactividad entre 1 y 5 - minutos de modificación, la localización de los grupos carboxilo modificados implicaba:

4º.- Modificación química con nucleófilo radiactivo, durante - esos tiempos, en las mismas condiciones que las descritas.

5º.- Aislamiento y purificación de los péptidos radiactivos - obtenidos por una digestión tróptica.

6º.- Identificación de los residuos marcados y cuantificación

de su incorporación radiactiva.

La Figura 12 muestra un esquema del trabajo realizado.

La discusión introduce los datos obtenidos en la panorámica actual de las relaciones estructura-función de inmunoglobulinas y especialmente en lo concerniente a la naturaleza de la interacción anticuerpo-Clq.

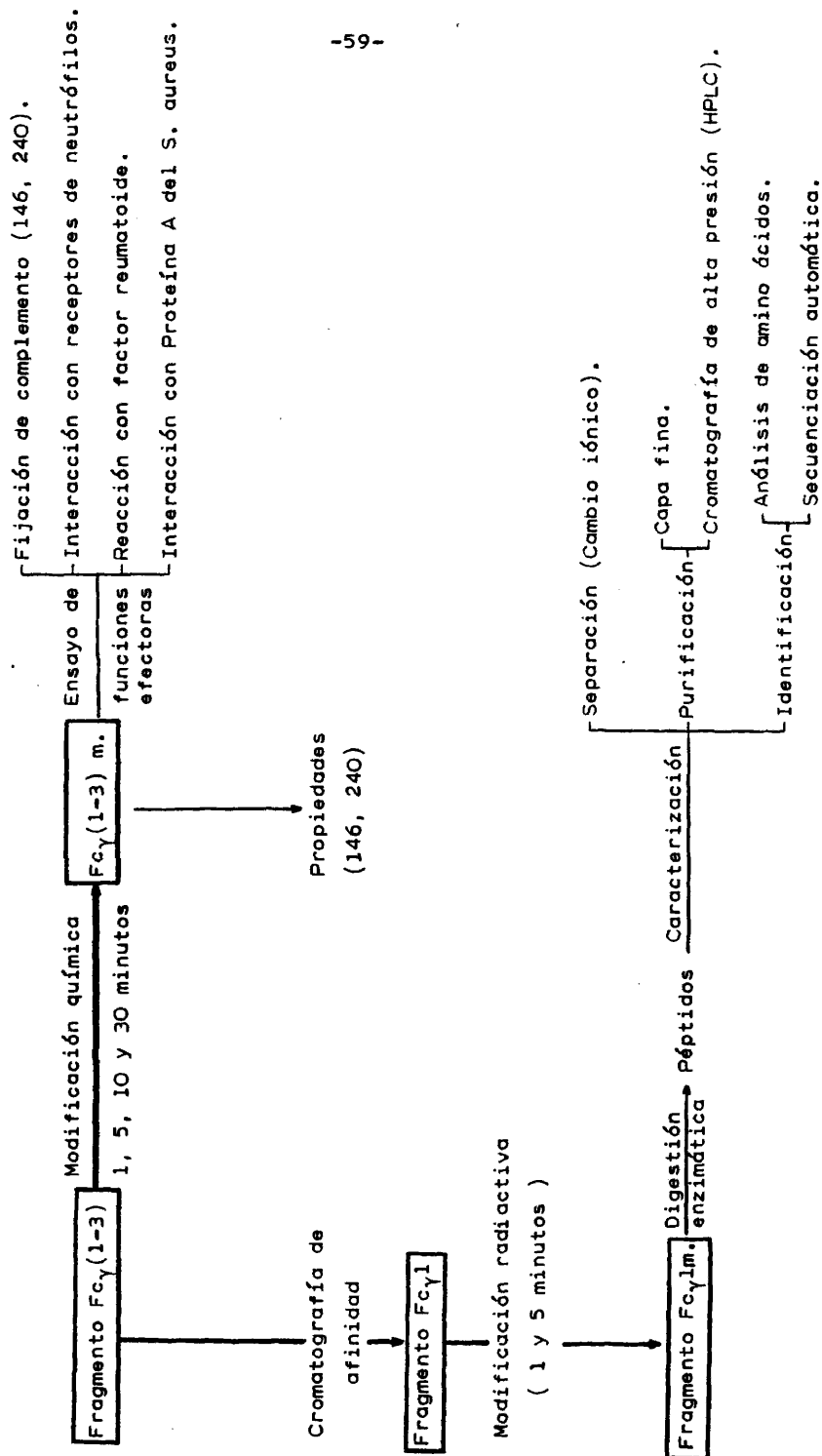


Figura 12

60

### 3.- MATERIALES Y METODOS.

### 3.1. AISLAMIENTO, PURIFICACION Y MODIFICACION QUIMICA DEL FRAGMENTO Fc.

#### 3.1.1. Obtención de IgG humana.

La IgG se obtuvo a partir de dos fuentes: de suero humano normal y de preparaciones comerciales (Kabi, lote nº - 53873). En el primer caso, se aisló a partir de sangre de donantes sanos. Una vez extraída se dejó en reposo durante tres horas a temperatura ambiente. Seguidamente, tras separar el coágulo se centrifugó a 2200g durante 15 minutos, despreciándose el sedimento.

La IgG se obtuvo según una modificación del método de Peterson y Sober (241). El suero de partida se enriqueció en su fracción Y por precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.33 M (concentración final), redisolución del precipitado y posterior diálisis frente a un tampón  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.01 M, pH 8.

El dializado se cromatógrafió por cambio de ión sobre columnas (2.6 x 30 cm.) de DEAE-celulosa (Whatman DE-32), siendo el eluyente el mismo tampón de la diálisis previa. Del único pico que eluye en estas condiciones se recogieron las fracciones cuya absorción a 280 nm es superior a 0.3, se concentraron por ultrafiltración a presión negativa en bolsas de celofán (Visking 8/32; 2.4 nm de diámetro de poro seco) y se centrifugaron a 3800 g durante 15 minutos para eliminar posibles agregados insolubles.

La IgG comercial es una preparación de inmunoglobulina humana liofilizada de gran pureza.

#### 3.1.2. Digestión enzimática de la IgG.

Se llevó a cabo según describieron previamente López de Castro y col. (242) que corresponde a una modificación



del método descrito por Stanworth (243). Una disolución de -- IgG humana (25 mg/ml) se incubó en tampón fosfato, 0.075 M, - pH 7.0 que contiene NaCl 0.075 M y EDTA 0.002 M, con papaína/ (cristalizada dos veces; Sigma) en una relación enzima/sustra to 1/100, durante cuatro horas a 30°C. La reacción se paró -- añadiendo N-etil-maleimida hasta 0.01 M de concentración fi-- nal. El digerido se dializó frente a un tampón  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{HCl}$  -- 0.005 M, pH 7.7.

### 3.1.3. Cromatografía en DEAE-celulosa.

Habitualmente se aplicó a columnas cromatográficas/ (K 50/60, Pharmacia) de DEAE celulosa microgranular (DE-32) - el digerido correspondiente a 1 gramo de IgG humana. Inicial- mente la elución se llevó a cabo con el antes mencionada tam- pón de diálisis durante 24 horas (flujo de 36 ml/hora). A con- tinuación se aplicó un gradiente lineal de fuerza iónica (fos- fato 0.005 M - 0.5 M) durante 48 horas. Se recogieron fraccio- nes de 9 ml y se determinó su absorbancia a 280 nm en un es- pectrofotómetro (Coleman 111-Hitachi Perkin Elmer).

### 3.1.4. Filtración en gel.

Las fracciones correspondientes al Fc humano se apli- caron a columnas de Pharmacia (2.6 x 100 cm) de Ultrogel AcA/ 54 equilibradas con tampón fosfato 0.01 M pH 7.2 que contiene NaCl 0.5 M y  $\text{NaN}_3$  0.05% (p/v). La elución se realizó con el - mismo tampón de equilibrado con un flujo de 20 ml/hora, reco- giéndose fracciones de 3 ml. El perfil cromatográfico se de- terminó espectrofotométricamente a 280 nm. Las fracciones co- rrespondientes al fragmento Fc se dializaron exhaustivamente/ frente a  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0.01 M y se liofilizaron, almacenándose a -- -20°C hasta su uso.

### 3.1.5. Control de pureza.

#### 3.1.5.1. Inmunodifusión doble bidimensional.

Se llevó a cabo en agar (Agar noble, Difco) al 1% -- (p/v) en NaCl 0.15 M según una modificación del método de --- Ouchterlony (244) frente a antisueros comerciales (Operon) an tiproteínas séricas totales humanas o anti- $\gamma$ -globulina humana, obtenidos en conejo.

#### 3.1.5.2. Inmunolectroforesis.

Se llevó a cabo por una modificación del método de/ Scheidegger (245). Se realizó en placas de agar (Agar noble,/ Difco) de 6.5 x 4.0 x 0.3 cm al 1.25% en tampón veronal (ácido 5,5'-dietil barbitúrico/5,5'-dietil barbiturato sódico, -- 0.06 M, pH 8.6,  $\mu$  0.03). La muestra se introdujo en orificios de 1 mm de diámetro equidistantes del eje longitudinal de la/ placa. La electroforesis se realizó en el tampón mencionado - aplicando una diferencia de potencial constante de 5 V/cm durante 70 minutos.

Tras la electroforesis, se practicó sobre el eje -- longitudinal una trinchera de 2 mm de ancho, se rellenó con - el antisuero correspondiente y se dejó en reposo en cámara húmeda, observándose el desarrollo de las bandas de precipitación a las 24 y 48 horas.

#### 3.1.5.3. Filtración en gel.

Se realizó en Sephadex G-200 en una columna de Pharmacia (2.5 x 75 cm, previamente calibrada según la metodología de Andrews (246). Como marcadores de peso molecular conocido se utilizaron: IgA humana sérica (160000 Dalton), fragmento F(ab')<sub>2</sub> de IgG de conejo (98000 Dalton), Albúmina bovina (66000 Dalton), Ovoalbúmina (43500 Dalton), Quimotripsinò-

geno de páncreas de ternera (23800 Dalton) y Mioglobina de ca-  
chalote (17800 Dalton) como eluyente se utilizó tampón fosfa-  
to 0.01 M, pH 7.2 que contiene NaCl 0.5 M y  $\text{H}_3\text{Na}$  0.05% (p/v).

#### 3.1.5.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS.

Se utilizó una modificación del método descrito por Weber y Osborn (247) para placas de 12 x 15 cm.

##### 3.1.5.4.1. Preparación de los geles.

Se partió de las siguientes soluciones:

- A) Acrilamida (Biorad) 30% p/v; N-N'-metilenbisacri-  
lamida (Biorad) 0.8% p/v en agua destilada. La so-  
lución, filtrada en papel, es almacenada a 4°C.
- B) Solución tampón Tris/HCl 1 M, pH 8.8.
- C) Solución tampón Tris/HCl 1 M, pH 6.8.
- D) SDS 20% p/v en agua destilada.
- E) Solución tampón Tris base 0.25 M, glicocola 1.92  
M, SDS 1% p/v pH 8.3.
- F) Persulfato amónico (Biorad) 10% p/v en agua des-  
tilada.
- G) Temed (Biorad).

La tabla 2 muestra las cantidades utilizadas (en ml)  
de estas disoluciones en función del reticulado.

##### 3.1.5.4.2. Desarrollo de la electroforesis.

De 30-50  $\mu\text{g}$  de muestra disueltos en 60-80  $\mu\text{l}$  del tam-  
pón de aplicación (Tris/HCl 0.08 M, pH 6.8 que contiene SDS -  
al 2%, glicerol al 2% y azul de bromofenol al 0.01%) se depo-  
sitaron en cada pocillo. La electroforesis se realizó a 50 V/  
mientras el marcador (azul de bromofenol) se encontraba en el

Gel de Resolución

	<u>15%</u>	<u>12.5%</u>	<u>10%</u>	<u>7.5%</u>
A	15.0	12.5	10.0	7.5
B	11.2	11.2	11.2	11.2
D	0.15	0.15	0.15	0.15
H <sub>2</sub> O dest.	3.7	6.2	8.7	11.2
F	0.1	0.1	0.1	0.1
G	0.02	0.02	0.02	0.02

Gel de Concentración

	<u>5%</u>	<u>3%</u>
A	1.67	1.0
C	1.25	1.25
D	0.05	0.05
H <sub>2</sub> O dest.	7.03	7.7
F	0.05	0.05
G	0.005	0.005

Tabla 2.

Cantidades utilizadas (en ml) en la preparación de geles de poliacrilamida, en presencia de SDS, en función del reticulado que se desea conseguir.

gel de concentración y a 100 V cuando pasó al gel de resolución.

Para reducir las muestras se añaden a éstas 10 µl - de ditiotreitól 1 M, y se las mantiene 5 minutos a 100°C. Independientemente de que las muestras sean reducidas todas las muestras fueron calentadas antes de someterlas a electroforesis.

Los geles se tiñen con azul Coomassie al 0.5% en alcohol metílico al 47% y ácido acético al 6% durante una noche. El destañido se realiza con la misma solución pero sin colorante.

### 3.1.6. Modificación química de grupos carboxilo.

Se realizó siguiendo el método original de Hoare y Koshland (248) con algunas modificaciones. Los ensayos se llevaron a cabo a concentración de proteína menor de la mínima recomendada con el fin de evitar la agregación covalente.

A una disolución 1 M del éster etílico de la glicocola (Koch-light Lab.) pH 4.75 (ajustado con NaOH 1 N) se añadió Fc hasta una concentración de 0.8 mg/ml. Se reajustó el pH a 4.75 con HCl 1 N y se añadió EDC sólida hasta una concentración final 0.1 M. La reacción se dejó transcurrir durante 30 minutos manteniendo el pH constante a 4.75 mediante la adición de HCl 1 N, y tomando alícuotas a 1, 5, 10 y 30 minutos. A cada alícuota se añadió un volumen igual de acetato sódico/ 2 M, pH 4.75, para bloquear la carbodiimida libre. Después de unos minutos a temperatura ambiente, las soluciones se cromatografiaron en las mismas condiciones que las descritas en 3.1.4. con objeto de eliminar los posibles agregados. Se realizaron experimentos control que contenían Fc y nucleófilo pero no carbodiimida.

### 3.2. ESTUDIO DE FUNCIONES BIOLOGICAS.

#### 3.2.1. Interacción con receptores celulares.

Se escogió como modelo experimental un sistema hombre/conejo teniendo como soporte celular neutrófilos humanos.

##### 3.2.1.1. Aislamiento de neutrófilos humanos.

El método seguido es una modificación del descrito por Boyum (249). A 20 ml de sangre heparinizada (5 u/ml) procedente de donantes sanos se añadieron 4.5 ml de una disolución de glucosa (3% p/v) y dextrana (3% p/v) en NaCl (0.9% p/v), dejándose sedimentar el conjunto durante 45 minutos en un ángulo de 45°. El sobrenadante se pipeteó a varios tubos - que se centrifugaron 5 minutos a 400 g. El sedimento de esta centrifugación se lavó tres veces con solución salina (fosfato 0.01 M pH 7.2, NaCl 0.15 M). Los eritrocitos presentes en las preparaciones se eliminaron por lisis hipotónica en  $\text{NH}_4\text{Cl}$  al 0.83% (p/v) durante 5 minutos a 37°C, seguida de centrifugación durante 5 minutos a 400 g. Las células sedimentadas se resuspendieron en solución salina y se lavaron tres veces en este medio en el que quedaron finalmente resuspendidas.

4 ml de la suspensión celular se depositaron cuidadosamente sobre 3 ml de Lymphoprep (densidad 1.077 g/ml, Nyegaard & Co.) en tubos de plástico de 17 x 100 mm. Se centrifugaron 20 minutos a 325 g y se despreciaron las células mononucleares presentes en la interfase.

Los sedimentos, que contienen las células polimorfo nucleares, se resuspendieron en solución salina, se lavaron - tres veces con la misma solución y finalmente se resuspendieron en ella.

De la suspensión celular se tomaron 10  $\mu\text{l}$  y se añá-

dieron sobre 90  $\mu$ l de azul de toluidina al 0.1% (p/v) en solución salina. Una alícuota de esta disolución se depositó en un hemocitómetro y se determinó el número de neutrófilos -- presentes en base a su morfología al microscopio óptico.

La viabilidad celular se determinó por exclusión de azul tripano (0.15%) de la preparación de células purificadas.

Finalmente, las células se centrifugaron 5 minutos/ a 400 g y se resuspendieron nuevamente en solución salina a una concentración de  $4 \times 10^6$  u  $8 \times 10^6$  células/ml.

#### 3.2.1.2. Sensibilización de eritrocitos de carnero.

1. ml de eritrocitos de carnero al 0.5%, en solución salina que contiene ovoalbúmina al 0.1%, se incubó con diluciones seriadas de IgG de conejo con actividad/anticuerpo anti hematies de carnero, obtenida en nuestro laboratorio (250), - durante 1 hora a 37°C.

#### 3.2.1.3. Formación de rosetas.

200  $\mu$ l de la suspensión celular ( $4 \times 10^6$  células/ml) se añadieron sobre 200  $\mu$ l de cada una de las preparaciones de eritrocitos sensibilizados, se centrifugó la mezcla durante 5 minutos a 40 g y se dejó a 4°C durante 2 horas. Transcurrido/ ese tiempo, los sedimentos se resuspendieron suavemente y una alícuota de cada suspensión se observó bajo microscopio óptico, determinándose el porcentaje de células polimorfonucleares que estaban rodeadas por más de tres eritrocitos (sólo en este caso se contabilizó una roseta como positiva). Se contaron un mínimo de 100 células y el número de ellas que estaban roseteadas se expresó como un porcentaje del total.

#### 3.2.1.4. Inhibición de la formación de rosetas.

Para este ensayo, y a partir de los datos obtenidos del apartado anterior, se escogió aquella dosis subaglutinante de anticuerpo que fue capaz de formar alrededor de un 80% de rosetas.

Alícuotas de 100 µl de la suspensión de células de  $8 \times 10^6$  células/ml se incubaron, a temperatura ambiente, con 100 µl de diluciones seriadas de las proteínas (nativa y modificada) cuya actividad citofílica va a ser ensayada. A continuación se añadieron 200 µl de eritrocitos sensibilizados con la dosis mencionada y se continuó el experimento en la forma detallada en el apartado anterior. La inhibición de la formación de rosetas se expresó como un porcentaje según la siguiente expresión:

$$\%I=100- \left( \frac{\% \text{ de rosetas en presencia de proteína}}{\% \text{ de rosetas en ausencia de proteína}} \times 100 \right)$$

#### 3.2.2. Interacción con el factor reumatoide.

Se escogió un sistema experimental basado en un ensayo de hemaglutinación, ya que es conocida la capacidad del factor reumatoide de aglutinar suspensiones de hematíes sensibilizados.

##### 3.2.2.1. Elección del suero.

Dentro del lote de sueros disponibles correspondientes a pacientes diagnosticados de artritis reumatoide, se escogieron aquellos que poseían un alto título de factor reumatoide (mayor o igual de 1/10240 determinado por el método estandar de Waaler-Rose, 251).



3.2.2.2. Inactivación y absorción del suero.

Con objeto de eliminar la capacidad hemolítica del suero, éste fue inactivado por calentamiento durante 1 hora a 56°C.

Para evitar posibles aglutinaciones inespecíficas, el suero fue absorbido con eritrocitos de carnero. 100 µl de suero inactivado se incubaron con 2 ml de hematíes de carnero (5% en solución salina) durante 1 hora a 37°C. Al cabo de ese tiempo, la suspensión se centrifugó durante 5 minutos a 400 g y se recogió el sobrenadante.

3.2.2.3. Sensibilización de eritrocitos.

2 ml de eritrocitos de carnero, al 1.6% en solución salina, se incubaron con diluciones seriadas de IgG de conejo con actividad anticuerpo anti-hematíes de carnero, obtenida en nuestro laboratorio (250), durante 1 hora a 37°C.

3.2.2.4. Determinación del título de aglutinación.

A 100 µl de diluciones seriadas del suero inactivado y absorbido se añadieron 50 µl de hematíes sensibilizados, con dosis subaglutinante de IgG, y 50 µl de solución salina. Se dejaron estar los tubos 18 horas a temperatura ambiente y al cabo de dicho tiempo se visualizó la aglutinación de cada tubo al compararla con dos tipos de controles: A) Eritrocitos sin sensibilizar y B) Eritrocitos sensibilizados pero sin suero patológico.

La dilución del suero en el último tubo con aglutinación positiva constituye el título.

3.2.2.5. Inhibición de la aglutinación.

Se trataba de inhibir la aglutinación que se produ-

cia en el último tubo considerado con aglutinación positiva./ Para ello, en los 50 µl de solución salina que se incluían en cada uno de los tubos, se incorporaron diluciones de los fragmentos proteícos que han de ser ensayados ( de 5-800 µg).

La inhibición conseguida en cada caso se compara visualmente con respecto a la aglutinación que se trata de inhibir y con respecto a los dos controles antes mencionados.

### 3.2.3. Interacción con la Proteína A del S. aureus.

Los ensayos de interacción entre el fragmento Fc y/ la Proteína A de la pared del S. aureus se realizaron por cromatografía de afinidad.

Para ello, cantidades conocidas de cada proteína -- (nativa y modificada en distinta extensión) se pasaron, por duplicado, por una columna (1 x 7 cm) de Sepharosa 4B-CL-Protein A (Pharmacia).

La interacción se expresa por comparación de los -- porcentajes de proteína excluida con el tampón de equilibrado y elución ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.5 M, pH 7) y proteína retenida (eluida -- con un tampón ácido Gly/HCl 1 M, pH3) por determinación de la absorbancia a 280 nm.

## 3.3. LOCALIZACION DE GRUPOS CARBOXILO.

### 3.3.1. Obtención de Fc<sub>γ</sub>1.

El producto de la digestión papáinica de la IgG resulta esencialmente una mezcla de Fc<sub>γ</sub>1 y Fc<sub>γ</sub>3, ya que la digestión enzimática transcurre a velocidad muy inferior para la subclase IgG2 y la IgG4 no se digiere.

Aprovechando la diferencia de afinidad de las subclases por la Proteína A del S. aureus, 20 mg de la mezcla se

pasaron a través de la columna mencionada en el apartado 3.2.3. El primer pico que se obtiene tras la elución con el tampón -  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.5 M, pH 7 corresponde a  $\text{Fc}_\gamma 3$ . La proteína retenida,  $\text{Fc}_\gamma 1$ , se eluye con el tampón Gly/HCl 1 M, pH 3 y se dializa in mediatamente, para evitar la desnaturalización proteica, fren te a una disolución de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0.01 M, para su liofilización.

El fragmento  $\text{Fc}_\gamma 1$  así obtenido se almacena a  $-20^\circ\text{C}$ / hasta su utilización.

### 3.3.2. Modificación química en condiciones radiactivas.

Se llevó a cabo como se describió en 3.1.6. excepto que el nucleófilo modificante fue hecho radiactivo por la adi ción de 1 mCi del ester etílico de 1- $^{14}\text{C}$ -glicocola (44.7 ----  $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$ , NEN), a una actividad específica final del nucleófi lo de 200  $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$ .

La radiactividad no incorporada fue eliminada por - diálisis exhaustiva frente a  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0.01 M y las muestras -- fueron subsecuentemente liofilizadas.

Este tipo de modificación solamente se realizó para tiempos de reacción de 1 y 5 minutos.

### 3.3.3. Reducción y alquilación.

5 mg de  $\text{Fc}_\gamma 1$  modificado radiactivamente fueron redu cidos, en 0.5 ml de un tampón pH 8.0 que contenía hidrocloru ro de guanidinio, Tris/HCl 0.5 M y EDTA 0.002 M. A esta diso- lución se añadió ditiotreitól a concentración final 10 mM, se burbujeó con  $\text{N}_2$  y se dejó estar durante 2 horas a temperatura ambiente.

Pasado ese tiempo, se añadió  $\text{ICH}_2\text{CONH}_2$  sólida hasta hacer 25 mM su concentración final. Tras 20 minutos a tempera- tura ambiente y en la oscuridad, la disolución se pasó por --

una columna (1.5 x 90 cm) de Sephadex G-75 superfino equilibrada con ácido acético 1 M, con objeto de extraer las sales/ y proceder a la liofilización de las muestras que contenían/ la proteína reducida y alquilada.

#### 3.3.4. Digestión con tripsina.

Las muestras reducidas y alquiladas se disolvieron/ (5-10 mg/ml) en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0.1 M, pH 8.2. Se añadió entonces tripsina (Merck) a una relación enzima:sustrato de 1:100, dos veces con un intervalo de 3 horas. Después de 6 horas de incubación a 37°C, las disoluciones fueron inmediatamente congeladas a -70°C y posteriormente liofilizadas.

#### 3.3.5. Purificación de péptidos.

##### 3.3.5.1. Cromatografía de cambio iónico.

###### 3.3.5.1.1. Preparación de la columna.

Una columna Gilson (0.3 x 25 cm) equipada con camisa de refrigeración fue rellena, bajo presión, con 2 gramos de una resina esférica (AA-20, Beckman) y mantenida a 55°C -- utilizando un baño de agua circulante. Después del empaquetamiento, la resina fue acondicionada por sucesivos lavados, de varios volúmenes de la columna cada uno, con NaOH 3 M,  $\text{H}_2\text{O}$ , - HCl 3 M,  $\text{H}_2\text{O}$  y Piridina 8 M (252). Finalmente, la columna se/ equilibró con un tampón Piridina/ácido acético 0.05 M, pH 1.8.

Tanto los lavados como el equilibrado de la columna se realizaron a presión (400 p.s.i.) y a un flujo de 7 ml/hora.

###### 3.3.5.1.2. Desarrollo de la cromatografía.

Los digeridos trópticos, disueltos en 400 µl del -- tampón de equilibrado, se cargaron en la columna, a presión,/ por medio de un inyector de muestras (Gilson). La cromatogra-

fia, en las condiciones de presión y flujo mencionados, se --  
realizó de la siguiente manera:

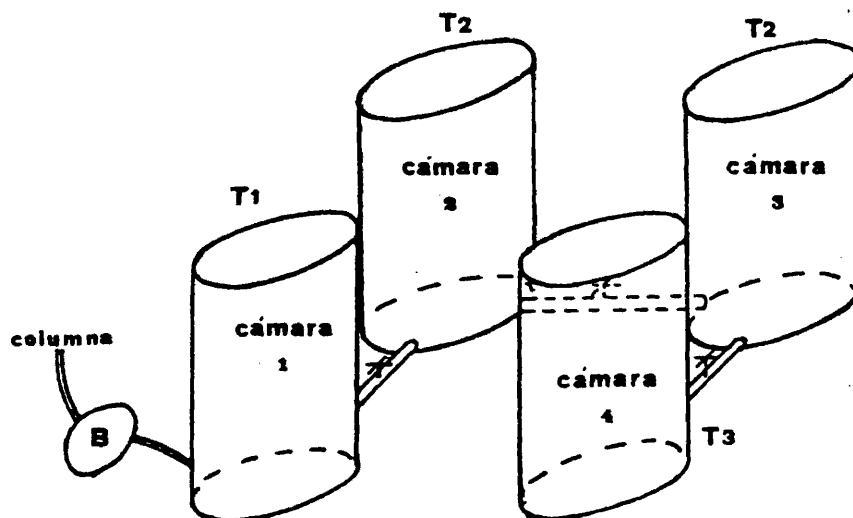
- 20 fracciones eluidas con el tampón de equilibrado.
- 160 fracciones eluidas con un gradiente combinado de pH y -  
fuerza iónica conseguido a base de tres tampones:

T1: piridina/acético 0.05 M, pH 2.45 (50 ml).

T2: piridina/acético 0.3 M, pH 3.75 (50 x 2 ml).

T3: piridina/acético 1.2 M, pH 5 (50 ml).

que se disponen en un formador de gradientes con cuatro cá-  
maras (Figura 13).



- 20 fracciones eluidas con piridina 2 M.

Todas las fracciones colectadas fueron de 1 ml.

### 3.3.5.1.3. Detección de péptidos.

Se realizó mediante una modificación del ensayo de fluorescamina descrito por Nakai (253). 100  $\mu$ l de cada fracción se secaron en estufa a 100°C. A continuación se añadieron a cada alícuota 100  $\mu$ l de NaOH 0.5 M y se hidrolizaron durante 45 minutos a 100°C. Después de neutralizar con 100  $\mu$ l de HCl 0.5 M, se añadió 1 ml de un tampón  $H_3BO_3$  0.25 M/NaOH - pH 8.5; a continuación, y con agitación vigorosa en Vortex, se añadieron 100  $\mu$ l de una disolución de fluorescamina (Roche) de 0.3 mg/ml en acetona.

La fluorescencia relativa de las muestras se determinó posteriormente en un espectrofluorómetro Aminco SPF-500/ utilizando 390 y 475 nm como longitudes de onda de excitación y de emisión respectivamente.

Para lograr bajos fondos de fluorescencia, la piridina (Merck) que se utilizó estuvo siempre destilada dos veces sobre ninhidrina (0.025% p/v) y almacenada a 4°C bajo  $N_2$ .

El perfil radiactivo de la cromatografía se obtuvo contando alícuotas de 50 o 100  $\mu$ l con 3 ml de Aquasol (NEN) - en un contador de centelleo líquido (Mark III, Amersham).

Paralelamente, la localización de péptidos se lleva a cabo por cromatografía analítica en capa fina. Para ello, - alícuotas de 40  $\mu$ l de cada fracción se aplicaron en placas de celulosa (20 x 20 cm, Merck) a intervalos de 15 mm. Una vez - secas todas las aplicaciones, las placas se depositaron en cámaras herméticas saturadas con el tampón de cromatografía --- (butanol:acético:agua:piridina, BAWP, 15:3:12:10) y se dejó - que ésta tuviera lugar durante 6 horas. La localización de los péptidos se llevó a cabo por tinción de la placa, previo lavado con acetona, con ninhidrina (0.3% p/v en acetona) durante/ 10 minutos a 80°C. Los péptidos radiactivos se localizaron --

por autoradiografía sobre películas X-Omat S (Kodak) durante 10 días. El revelado se efectuó automáticamente en una procesadora de revelado RPY-Omat (Kodak).

#### 3.3.5.2. Cromatografía preparativa en capa fina.

Ocasionalmente, mezclas sencillas de péptidos que coeluyeron en la cromatografía de cambio iónico se resolvieron por esta técnica (254). Para ello, las muestras se liofilizaron y se redisolviéron en 40 µl de BAWP. A continuación, se aplicaron en bandas de 10 mm y se cromatografiaron durante 6 horas. La tinción se realizó con ninhidrina (0.15% en acetona), previa colocación de tiras de plástico de 8 mm de ancho y 20 cm de alto sobre las aplicaciones, de forma que sólo quedaban revelados los extremos de las manchas. Los péptidos radiactivos se visualizaron por autoradiografía con exposición de 4 días.

Las manchas radiactivas se marcaron sobre las placas de celulosa y el área correspondiente se rascó cuidadosamente con espátula fina.

La extracción de los péptidos se realizó por agitación vigorosa de la celulosa con 100 µl de HCl 6 M (tridestilado) durante 30 minutos y posterior centrifugación a 10000 g en microfuga (Beckman TMB). El proceso se repitió tres veces/recogiéndose siempre el sobrenadante.

#### 3.3.5.3. Cromatografía líquida de alta presión.

Se utilizó para la resolución de mezclas complejas de péptidos en cantidades preparativas.

Se llevó a cabo en un cromatógrafo líquido (Waters) equipado con una columna Du Pont Zorbax C<sub>8</sub> (4.6 x 250 mm). Como eluyente se utilizó un sistema tampón de acetato amónico -

10 mM, pH 6.5 y acetonitrilo, recogién dose fracciones de 0.5/ ml a un flujo de 1.5 ml/minuto. Se aplicó un gradiente lineal de acetonitrilo (0-30%) durante 55 minutos, recogién dose antes y después de éste 20 fracciones en las condiciones iniciales y finales.

100 µl de cada fracción se desecaron en viales de - contaje, se disolvieron en 3 ml de Aquasol y se contaron en - un contador de centelleo líquido (Beckman).

### 3.3.6. Caracterización de péptidos radiactivos.

#### 3.3.6.1. Análisis de aminoácidos.

Las muestras se hidrolizaron con HCl 5.7 N (Pierce), que contenía 0.1% de fenol, durante 24 horas a 110°C en tubos cerrados a vacío. Transcurrido este tiempo, se eliminó el ácido por liofilización y las muestras hidrolizadas se disolvieron en el tampón inicial de corrida del analizador (Durrum -- D-500 o Beckman 121 M).

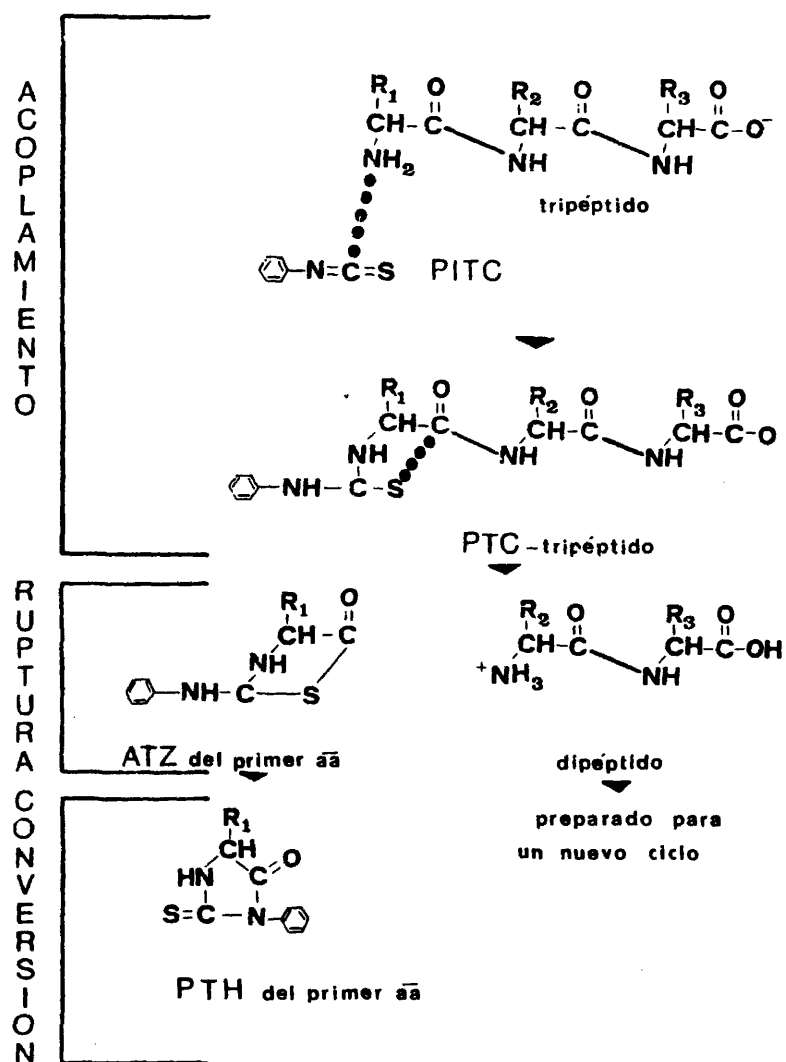
#### 3.3.6.2. Determinación de la secuencia.

Los péptidos radiactivos fueron secuenciados en un/ secuenciador automático Beckman, modelo 890 C, en presencia - de polibreno (255, 256) con un programa de Quadrol 0.1 M.

Inicialmente, 3 mg de polibreno disueltos en 100 µl de agua se introdujeron en la copa de reacción, se secaron y/ a continuación se corrió un ciclo completo o "ciclo en blanco". Tras esto, la muestra se aplicó disuelta en 300 µl de ácido - acético, se secó y se secuenció con el programa mencionado.

La Figura 14 muestra un esquema de las reacciones - químicas que tienen lugar en la degradación secuencial.





**Figura 14.-** Esquema de las reacciones químicas que tienen lugar durante la degradación secuencial.

### 3.3.6.2.1. Determinación de Pths e identificación de residuos radiactivos.

Puesto que las anilintiazolinonas (ATZ) obtenidas/ en los sucesivos ciclos son poco estables, es preferible llevarlas a sequedad en corriente de  $N_2$  y convertirlas en sus -- isómeros estables correspondientes, las feniltiohidantoínas - (Pths, Figura 14).

La conversión se efectuó por adición de 200  $\mu$ l de - HCl 0.1 M e incubación a 80°C durante 10 minutos (257). Las - Pths se extraen por dos veces con acetato de etilo (1 ml) mediante agitación vigorosa en Vortex. La fase orgánica separada se llevó a sequedad con  $N_2$  y la Pth contenida en ella se - redisolvió en 20  $\mu$ l de acetato de etilo para proceder a su ca racterización.

Normalmente se utilizó el 20% de cada Pth para su - identificación y cuantificación en un cromatógrafo líquido de alta presión (Waters) equipado con una columna de compresión/ radial Bondapack (10 x 0.8 cm). Después de la inyección de la/ muestra, su elución se llevó a cabo con un gradiente lineal - de acetato sódico 40 mM, pH 5.6 y acetonitrilo 18-37%, monitorizándose su presencia espectrofotométricamente a 254 nm -- por medio de un registrador automático que lleva acoplado un/ integrador (Data Module, Waters).

La identificación y cuantificación de las muestras/ se realizó por comparación, del tiempo de retención y del área encerrada bajo los picos, con un estandar. No se identificaron las Pths correspondientes a His y Arg que permanecen en la fa se acuosa.

La porción restante de cada Pth-aminoácido (80%) - se desecó bajo  $N_2$  en un vial de conteo, se disolvió en 3 ml/ de Aquasol y se contó su radiactividad en un contador de cen-

telleo líquido (Beckman).

### 3.3.6.3. Determinación de la actividad específica.

Una estimación de la actividad específica de los residuos radiactivos se llevó a cabo a partir de la radiactividad medida y de la cantidad de péptido estimada a partir del rendimiento de sus correspondientes Pths. Ambos parámetros -- fueron extrapolados a su valor en el primer ciclo mediante el cálculo previo del rendimiento repetitivo de la degradación - de Edman para el péptido correspondiente, según la fórmula:

$$\log R_r = \frac{1}{N_b - N_a} \log\left(\frac{a}{b}\right) \quad (258)$$

donde a y b son las cantidades detectadas de los residuos a y b;  $N_a$  y  $N_b$  son las posiciones de los residuos a y b.

El cálculo del rendimiento repetitivo de péptidos - pequeños está sujeto a un error considerable puesto que éstos pueden ser barridos de la copa de reacción en distinto grado/, en función esencialmente de su composición química. Por tanto, es importante notar que la determinación de actividades específicas por este método tiene sólo un valor estimativo.

### 3.3.7. Análisis de accesibilidad.

La exposición al solvente de los residuos modificados se estimó por un análisis de accesibilidad, a partir de - las coordenadas atómicas del fragmento  $Fc_{\gamma 1}$  (107).

Inicialmente se calculó el centro geométrico,  $C_g$ , - de los dominios  $C_{\gamma 2}$  y  $C_{\gamma 3}$ . A continuación, se descartaron todos los átomos contenidos dentro de una esfera de radio  $C_g - C_{\alpha}$ , siendo  $C_{\alpha}$  el carbono alpha de cada residuo modificado. Por - el contrario, todos los átomos incluidos en una nueva esfera/

-81-

de 7 Å de radio a partir del  $C_\alpha$  correspondiente, y no incluidos en el volumen mencionado anteriormente, fueron tomados en cuenta.

Para todo ello se utilizó un computador Univac 1100.

4.- RESULTADOS.

#### 4.1. AISLAMIENTO, PURIFICACION Y MODIFICACION QUIMICA DEL FRAGMENTO Fc.

##### 4.1.1. Obtención de la IgG humana.

La Figura 15 muestra el perfil del eluido de la cromatografía en DEAE-celulosa del suero humano normal. La zona/entre líneas de trazos se concentró y se comprobó su pureza.

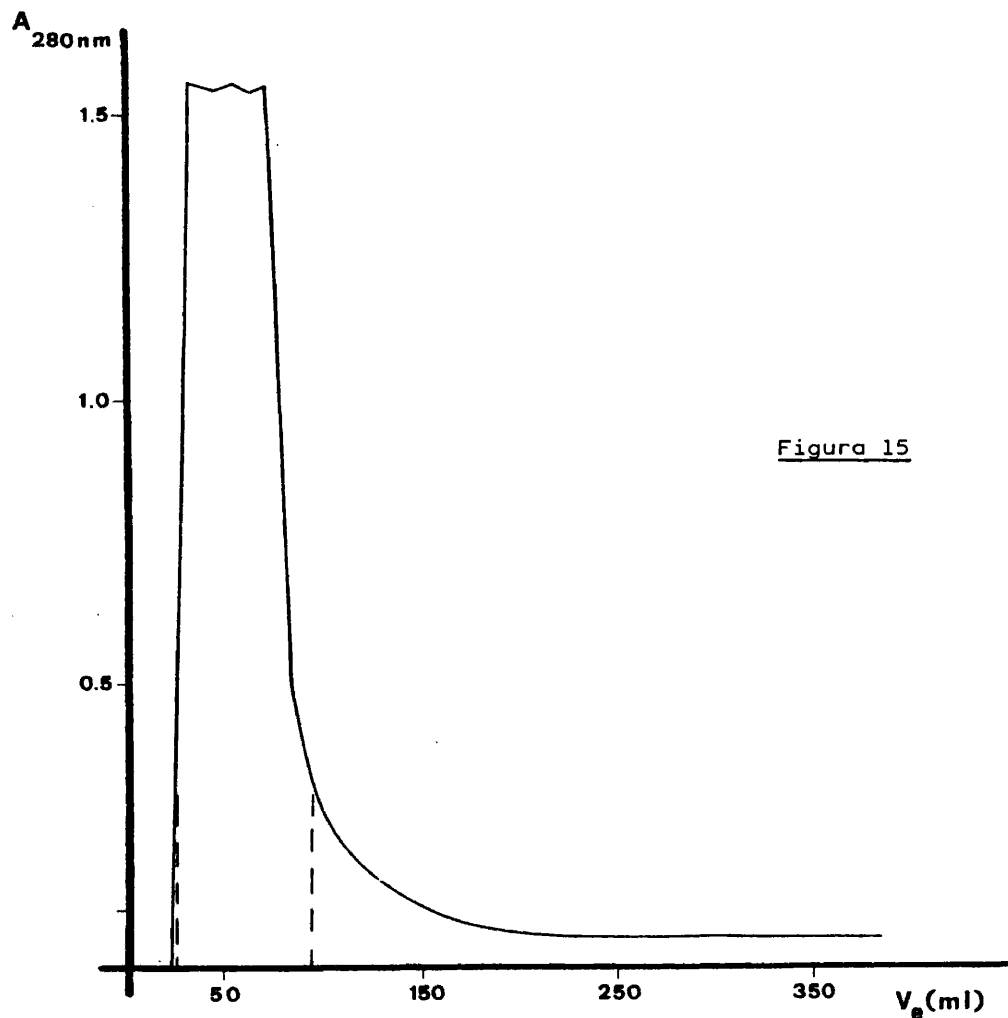


Figura 15

La Figura 16 es una inmunolectroforesis de la IgG/ obtenida (pocillo superior) a partir del suero humano normal/ (pocillo inferior) revelada con un antisuero antiproteína sé- ricas totales. Sólo se consideraron puras aquellas preparacio- nes que, como la mostrada, dieron un único arco de precipita- ción

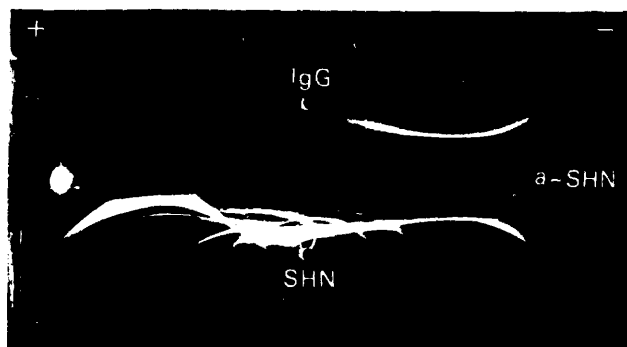


Figura 16

La Figura 17 es un inmunodifusión doble bidimensio- nal correspondiente a 6 preparaciones distintas de IgG (3 ob- tenidas a partir de suero y 3 comerciales). El antisuero del/ pocillo central es antisuero normal. Por este criterio, se -- consideraron puras las preparaciones en las que sólo se apre- ció una única banda de precipitación.

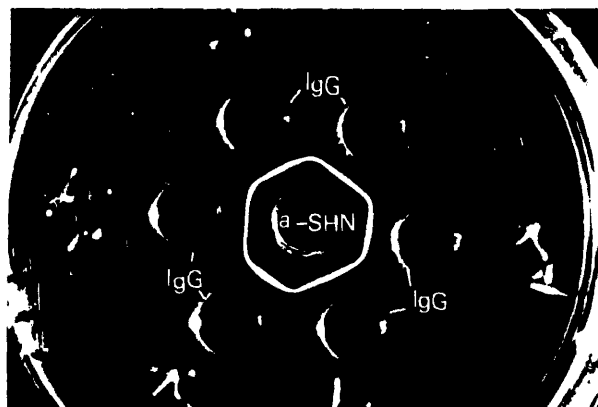


Figura 17

#### 4.1.2. Digestión enzimática de la IgG.

La Figura 18 es una inmunolectroforesis del digerido papáfnico de la IgG (pocillo superior) en comparación con/ IgG nativa (pocillo inferior). Se utilizó un antisuero anti-- IgG humana. De los tres arcos de precipitación el de movili-- dad más rápida corresponde al Fc y el de más lenta al Fab, -- producto que también aparece como consecuencia de la diges--- tión. El intermedio corresponde a IgG.

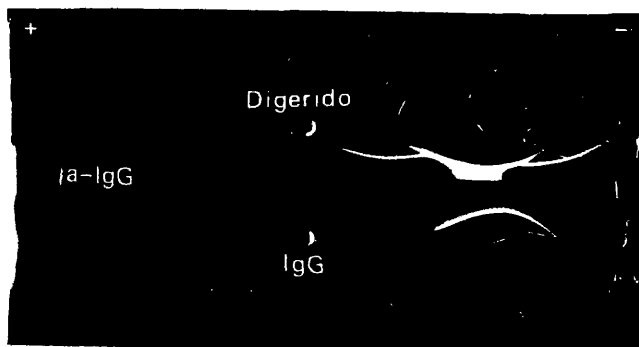


Figura 18

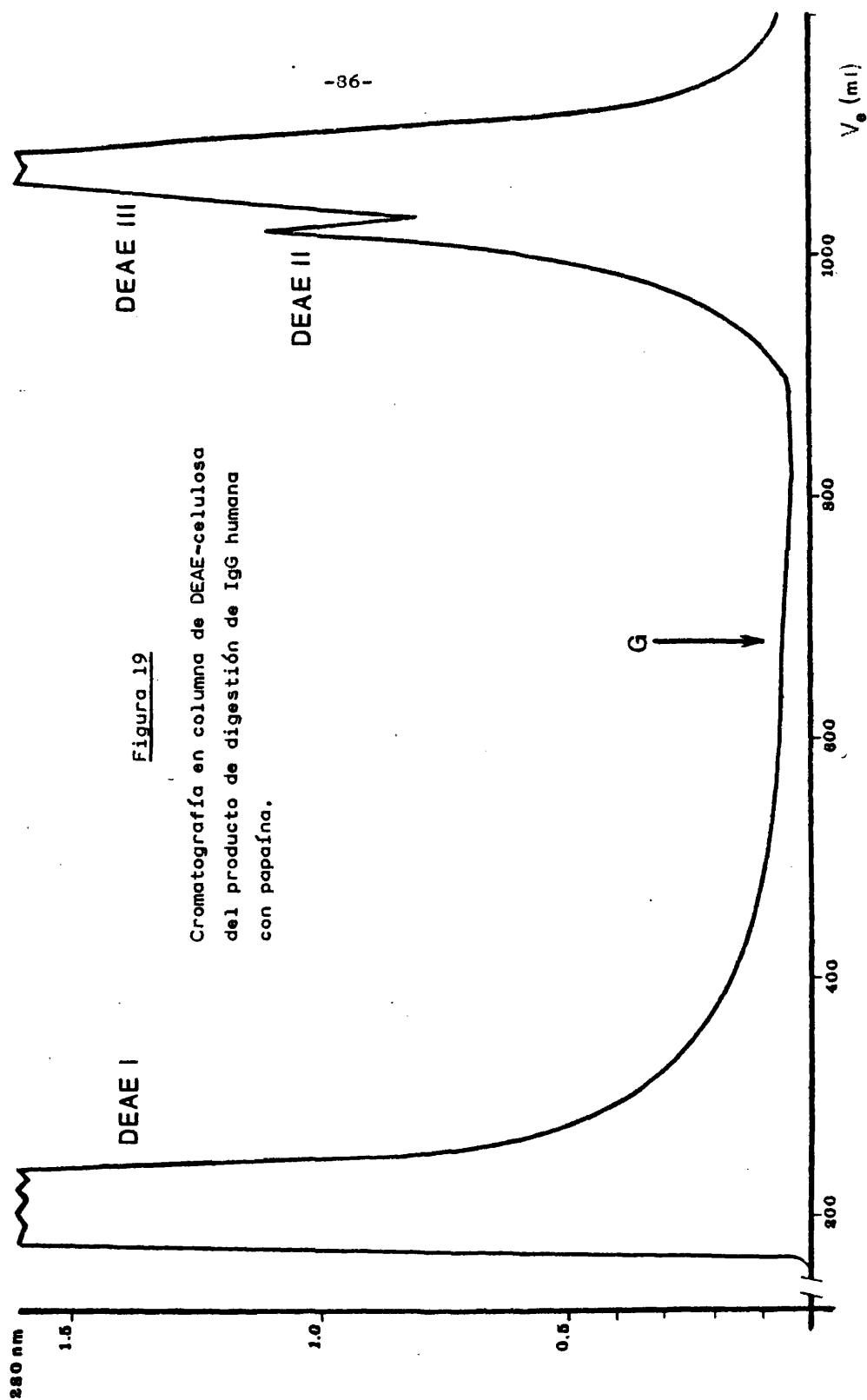
#### 4.1.3. Cromatografía en DEAE-Celulosa.

La Figura 19 muestra el perfil del eluido del digerido papáfnico cuando se somete a cromatografía de cambio iónico en las condiciones descritas en el apartado 3.1.3.. El - pico DEAE II corresponde fundamentalmente a IgG y a algo de - Fab. El pico DEAE III corresponde al fragmento Fc.

#### 4.1.4. Filtración en gel.

La Figura 20 corresponde a la filtración por Ultro- gel Aca 54 de la proteína eluida en el pico DEAE III. De los/ dos picos obtenidos, el primero corresponde a IgG resistente/





a la papaína y que venía contaminando al Fc (DEAE III) como un hombro poco resuelto (DEAE II).

El segundo pico corresponde al fragmento Fc.

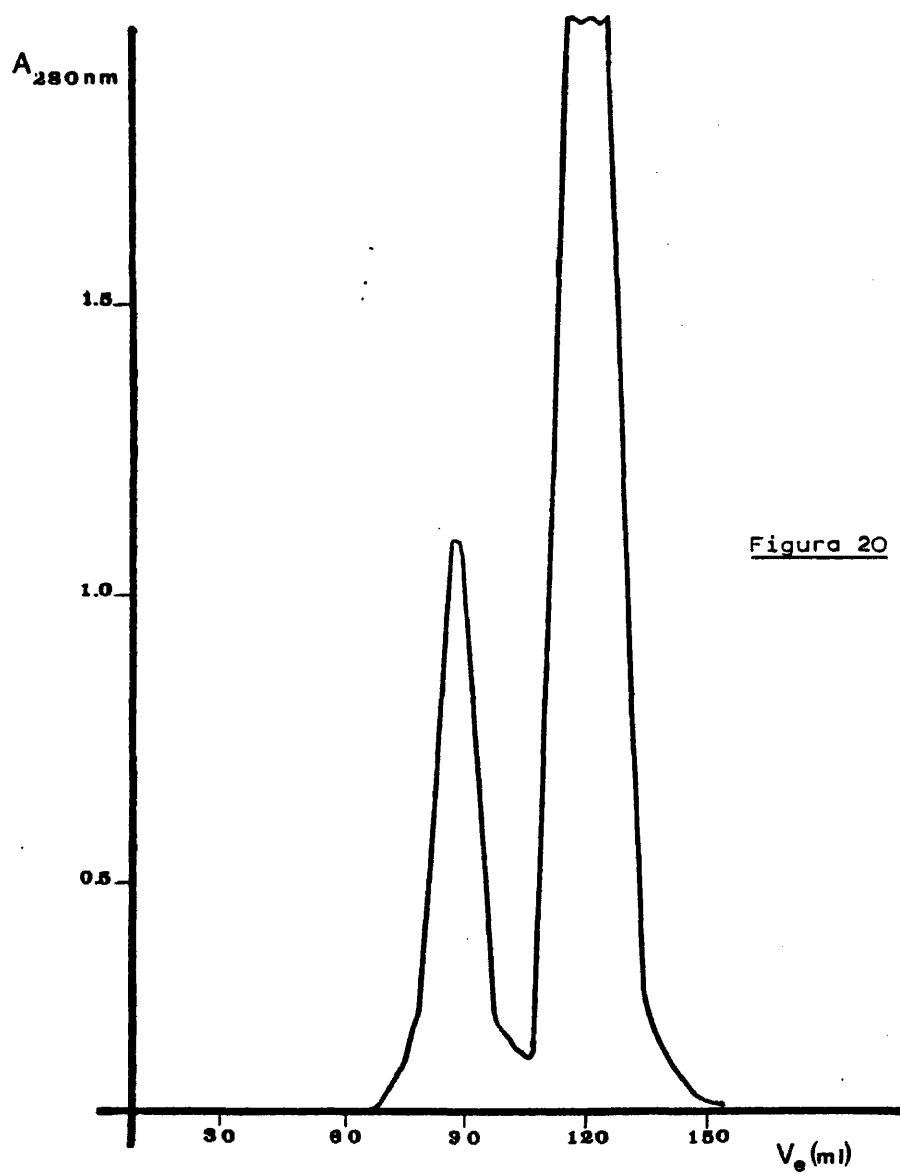


Figura 20

#### 4.1.5. Control de pureza.

##### 4.1.5.1. Immunodifusión doble bidimensional.

El fragmento Fc obtenido ha de dar una sólo banda - en inmunodifusión doble bidimensional frente a antisuero humano total. En la Figura 21 se puede observar esto siendo ello evidencia de la pureza de las preparaciones. Como confirmación observese la reacción cruzada con la IgG de partida.

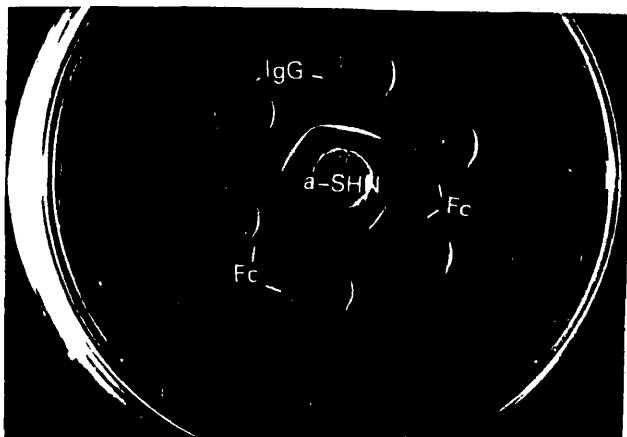


Figura 21

##### 4.1.5.2. Inmunoelectroforesis.

En inmunoelectroforesis se observa igualmente un sólo arco de precipitación frente a antisuero humano total lo que es indicativo de pureza. En la Figura 22 se muestran dos preparaciones distintas de Fc puras.

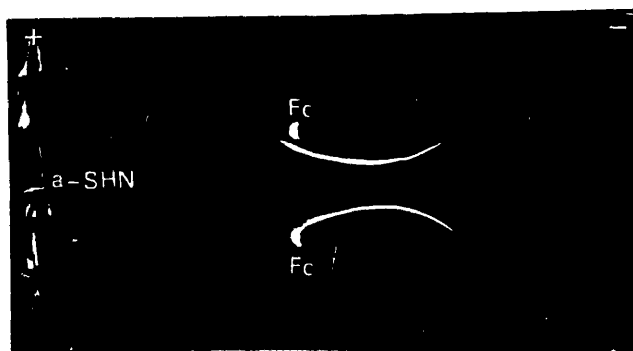


Figura 22

#### 4.1.5.3. Filtración en gel.

El perfil de elución de una preparación de Fc a través de Sephadex G-200 se muestra en la Figura 23. Como se ve, aparece un único pico, indicativo de pureza, cuyo volúmen de elución se corresponde con una especie molecular de 53000 Dalton (Figura 24).

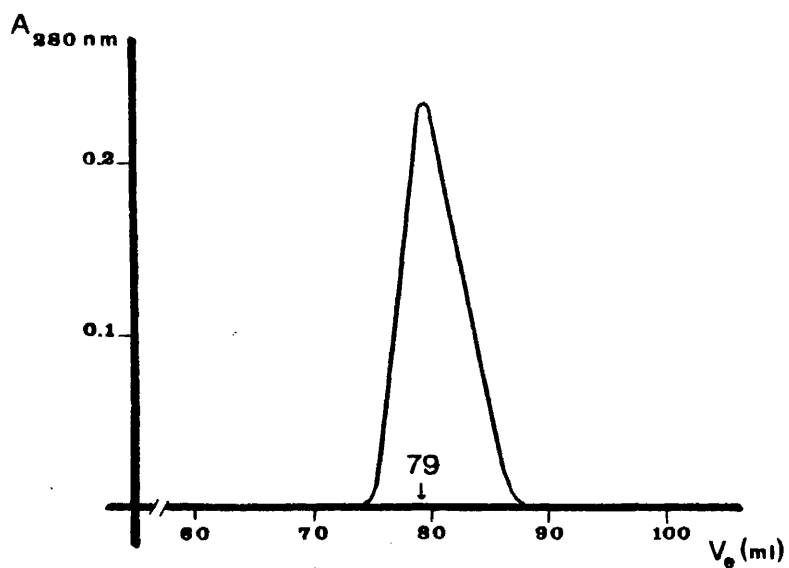


Figura 23

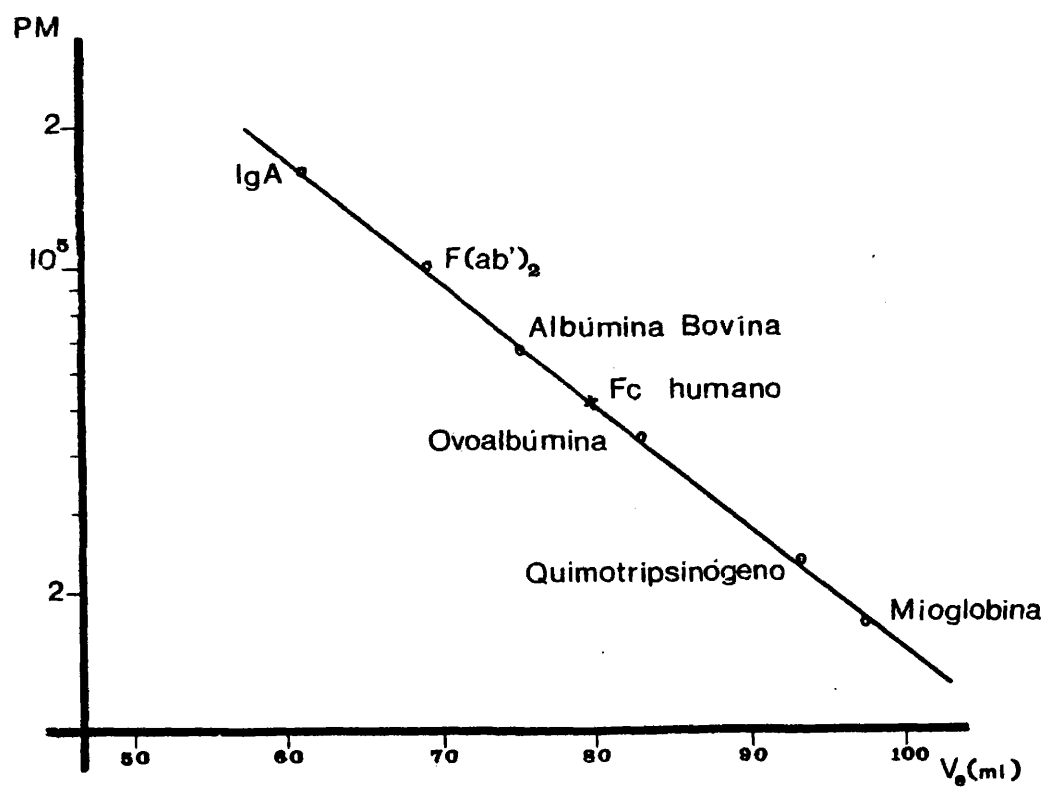


Figura 24

Representación de los volúmenes de elución ( $V_e$ ) de/ las proteínas patrones y del Fc frente al logaritmo de sus pesos moleculares.

#### 4.1.5.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS.

La electroforesis en gel de poliacrilamida (12.5%)/ de las preparaciones de Fc muestran una única banda que corresponde a una especie molecular de aproximadamente 53000 Dalton. En presencia de agentes reductores esta banda desaparece y -- aparece otra correspondiente a un peso molecular aparente de/ unos 27000 Dalton (Figura 25).

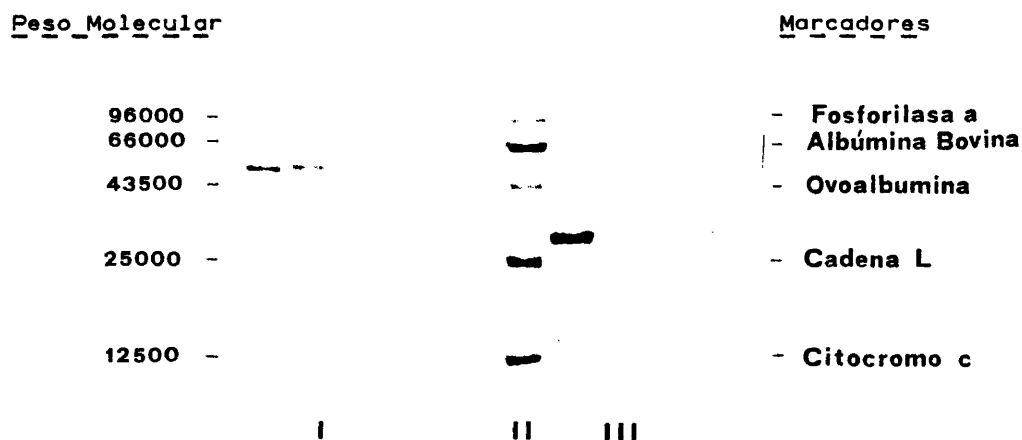


Figura 25

I.-Preparaciones de Fc<sub>γ</sub> sin reducir; II.-Marcadores;  
III.-Preparaciones de Fc<sub>γ</sub> reducido.

#### 4.1.6. Modificación química de grupos carboxilo.

La naturaleza de las reacciones químicas implicadas en la modificación de grupos carboxilo utilizando carbodiimidas solubles en agua (248) puede verse en la Figura 26.

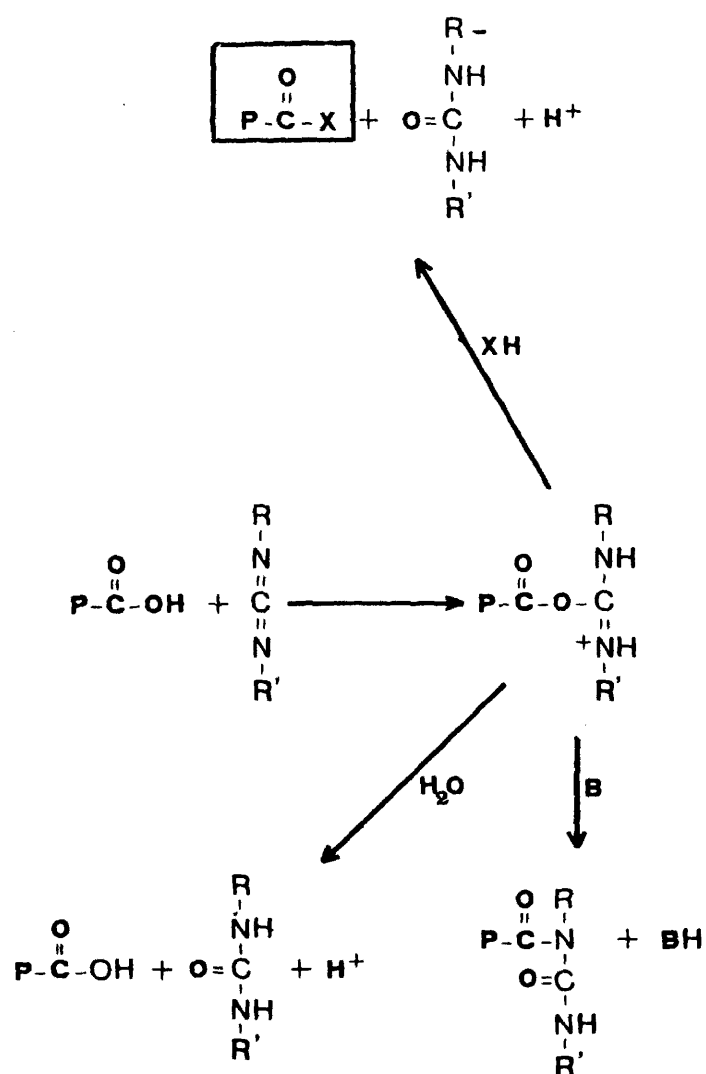


Figura 26. Reacción de modificación de grupos carboxilo mediada por carbodiimidas. B=base; XH=nucleófilo.

La Figura 27 representa el curso de la reacción de modificación de grupos carboxilo en el fragmento Fc, en función del tiempo. En ordenadas puede verse la cantidad de HCl/1 M añadido durante la primera media hora de reacción para -- mantener el pH constante a 4.75.

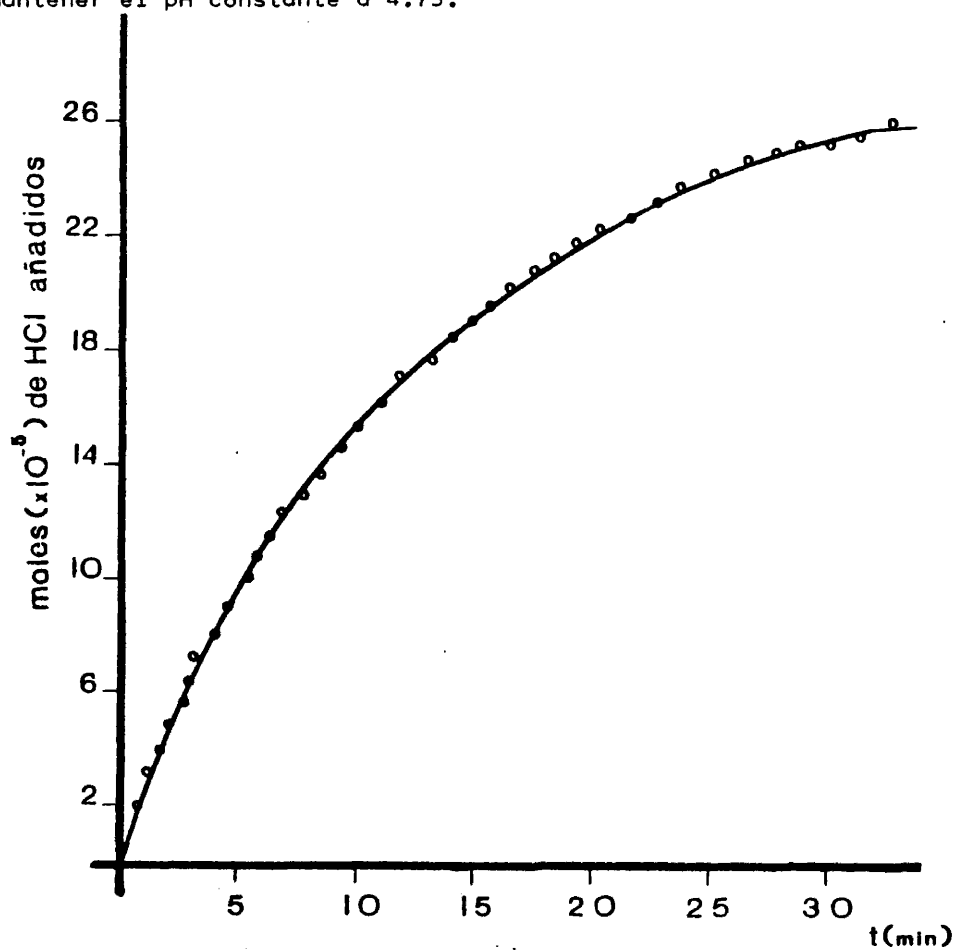


Figura 27



La Figura 28 es una inmunolectroforesis de las -- preparaciones del Fc nativo y modificado a distintos tiempos. El antisuero utilizado fue un suero específico anti-cadenas  $\gamma$  humanas. Observe la pureza de las preparaciones así como el cambio de movilidad experimentado.

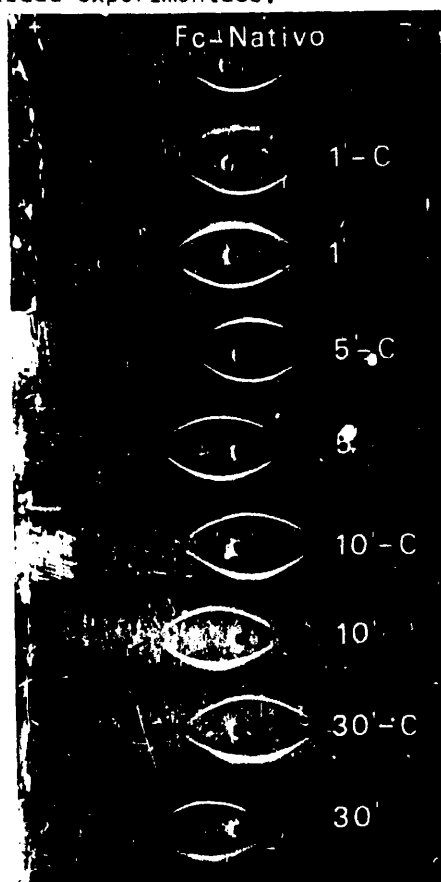


Figura 28

Un exhaustivo estudio de las características de la reacción seguida así como de los detalles estructurales de -- los fragmentos modificados ha sido ya descrito (146, 240).

## 4.2. ESTUDIO DE FUNCIONES BIOLOGICAS.

### 4.2.1. Interacción con receptores celulares.

#### 4.2.1.1. Aislamiento de neutrófilos humanos.

Las células obtenidas según se describió en 3.2.1.1. rinden preparaciones con una población del 90-95% de pureza en neutrófilos de acuerdo con su morfología tras tinción con azul de toluidina. Asimismo, las preparaciones presentaron habitualmente una viabilidad del 95% medida por exclusión de azul tripano.

#### 4.2.1.2. Formación de rosetas.

La siguiente Tabla muestra la capacidad de formación de rosetas de IgG anti-eritrocito con neutrófilos humanos. Como control se utiliza IgG anti-albúmina humana.

% FORMACION DE ROSETAS

<u>Conc x 10<sup>6</sup> (a)</u>	<u>IgG-aE</u>	<u>IgG-aA</u>
6.8	10(±3)	3(±1)
13.6	28(±5)	2(±1)
23.3	50(±5)	2(±1)
35.5 (b)	75(±4)	3(±1)
46.0	97(±5)	2(±1)
67.0		2(±1)
94.0		2(±0)

(a) Micromoles de proteína utilizados para sensibilizar 1 ml de eritrocitos al 0.5%.

(b) Dosis utilizada para los experimentos de inhibición.

#### 4.2.1.3. Inhibición de la formación de rosetas.

La Figura 29 muestra el comportamiento del Fc nativo y modificado a distintos tiempos en lo que respecta a su capacidad de inhibir la formación de rosetas.

Como puede verse, en presencia de Fc nativo y Fc-1' y en un intervalo de concentraciones de  $10^{-6}$ - $10^{-5}$  M el número de rosetas disminuyó apreciablemente en una forma dosis-dependiente. El 50% de inhibición correspondió, en ambos casos a una concentración de  $3 \times 10^{-6}$  M. Fc-10' y Fc-30' redujeron al 20%, aproximadamente, el número de rosetas sin evidencia de dependencia con la dosis. Este valor fue tomado como fondo de actividad. Fc-5' sólo mostró alguna actividad residual a concentraciones tan elevadas como  $10^{-4}$  M.

La parte inferior de la figura muestra los tantos por ciento de inhibición a la concentración intermedia de  $10^{-5}$  M.

#### 4.2.2. Interacción con el factor reumatoide.

La elección de la dosis subaglutinante de IgG se realizó a simple vista. La dosis utilizada fue de  $50 \times 10^{-6}$   $\mu$ moles/ml de eritrocitos al 1.6%.

##### 4.2.2.1. Determinación del título de aglutinación.

La Figura 30 muestra la aglutinación, de eritrocitos sensibilizados, por factor reumatoide según diluciones seriadas de éste. En la figura que se muestra el título lo determina la dilución del suero en el tubo 8 (1/5120). A y B son los dos controles descritos en 3.2.2.4.

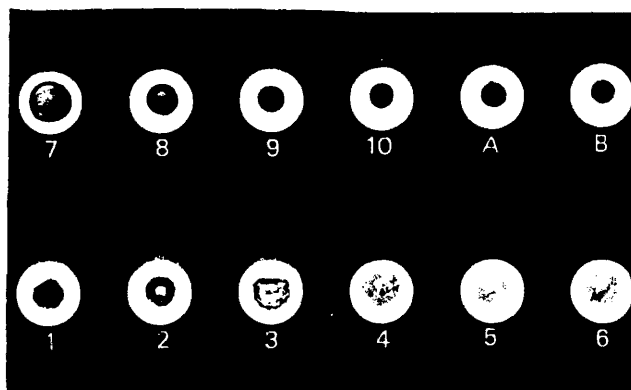
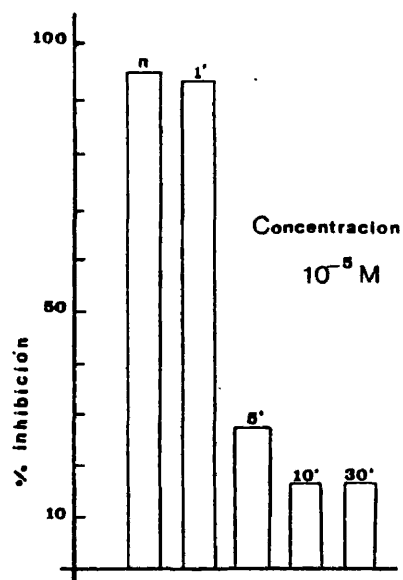
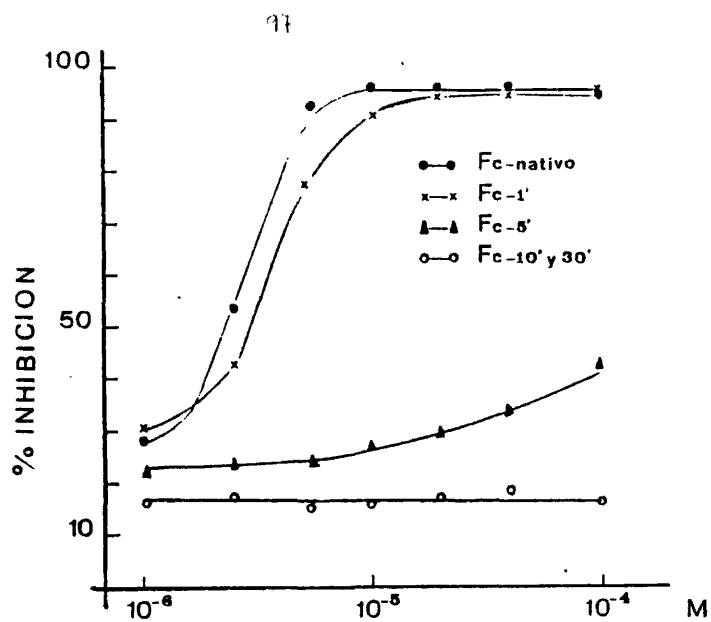


Figura 30



**Figura 29.-** Comportamiento del Fc nativo y modificado a distintos tiempos en la inhibición de la formación de rosetas. En la parte inferior se detalla esto a una concentración intermedia ( $10^{-5}$  M).

#### 4.2.2.2. Inhibición de la aglutinación.

Por debajo de concentraciones  $10^{-5}$  M no se observó/ diferencia alguna de comportamiento entre la proteína nativa/ y la modificada en diferente extensión (datos no mostrados). Por encima de esta concentración se observó una gradual incapacidad para inhibir la aglutinación según aumenta el tiempo/ de modificación. La Figura 31 muestra ésto graficamente. En la fotografía superior la concentración de proteína es, en to dos los casos,  $10^{-5}$  M. En la inferior 5 veces superior. C es/ el tubo control cuya aglutinación se trata de inhibir. A y B son los controles ya mencionados.

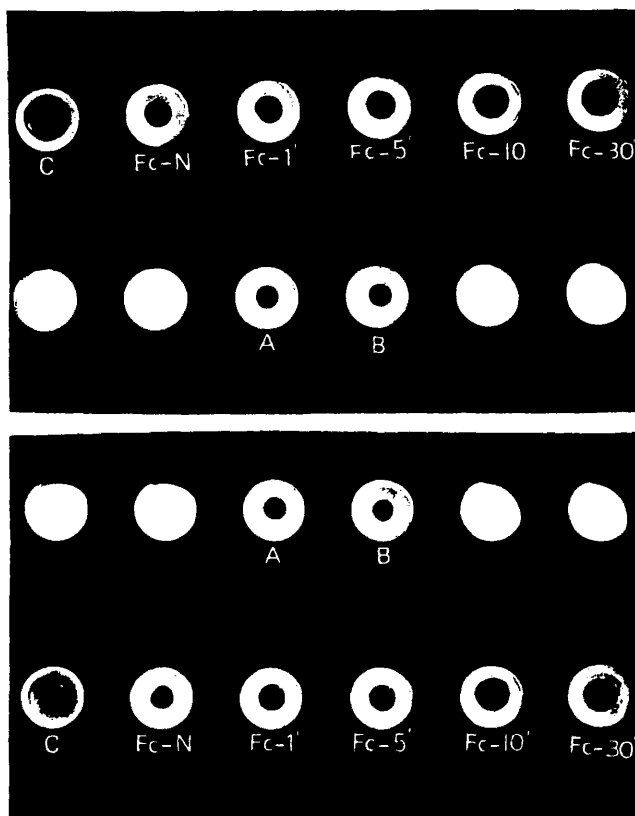


Figura 31

#### 4.2.3. Interacción con la Proteína A del S. aureus.

La Figura 32 muestra la diferencia de interacción, entre la proteína nativa y las modificadas, con la Proteína A del S. aureus. Como puede verse, sólo a 30 minutos de modificación, cuando la proteína ha sufrido importantes cambios con formacionales (146, 240), se observa una diferencia de comportamiento. Los porcentajes se refieren a la cantidad de proteína eluída con el tampón Gly/HCl pH 3 respecto a la cantidad de proteína total cargada en la columna.

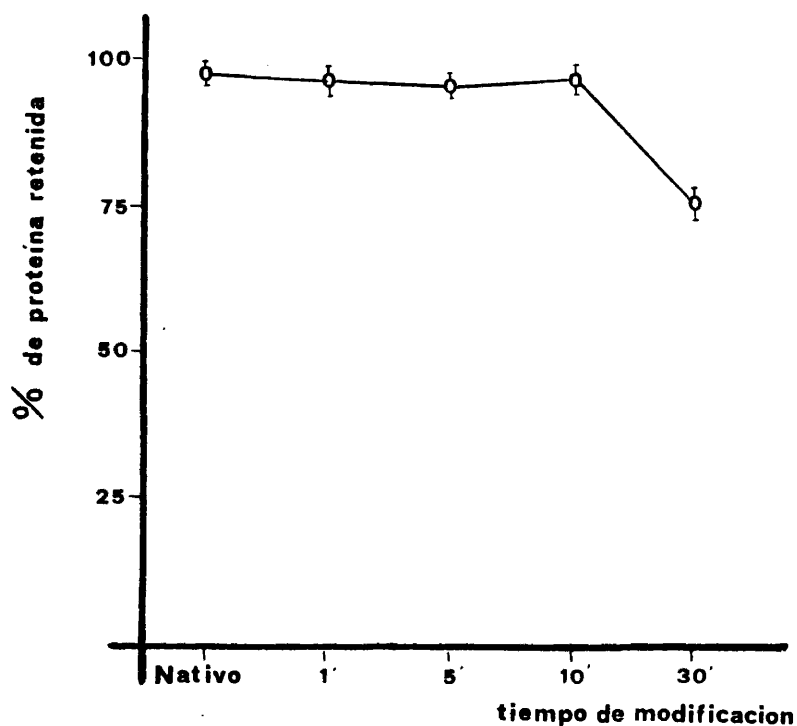


Figura 32.

#### 4.3. LOCALIZACION DE GRUPOS CARBOXILO.

##### 4.3.1. Obtención de $Fc_{\gamma 1}$ .

Ya que las técnicas que posteriormente se iban a -- utilizar requerían una extremada homogeneidad en cuanto a la especie molecular, se procedió a la separación del  $Fc_{\gamma 3}$  de la preparación de Fc purificado a partir del digerido de IgG que como se ha mencionado consiste en una mezcla de  $Fc_{\gamma 1}$  y  $Fc_{\gamma 3}$ .

La Figura 33 muestra el perfil característico del -- eluido de una columna de Sepharosa-4B-CL-Proteína A cuando a través de ella se pasa una mezcla de  $Fc_{\gamma 1}$  y  $Fc_{\gamma 3}$ . El segundo pico,  $Fc_{\gamma 1}$ , es el que se recoge y almacena para su uso. El -- perfil observado se corresponde con la relación cuantitativa/ existente entre las subclases 1 y 3 presentes en cualquier -- muestra de un pool de IgG.

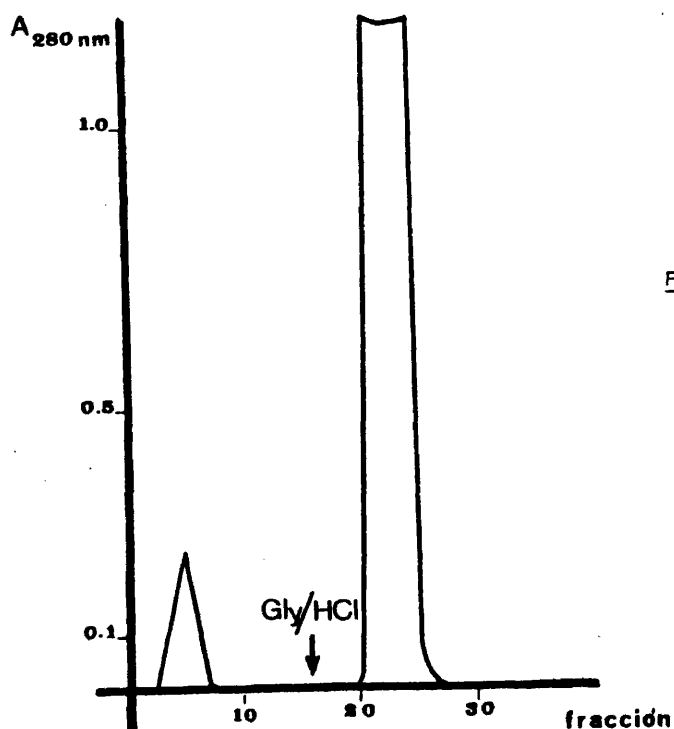


Figura 33

#### 4.3.2. Modificación química radiactiva de grupos carboxilo.

Ya que las pérdidas drásticas de funcionalidad se observaron entre 1 y 5 minutos de modificación, sólo se procedió a la modificación radiactiva durante estos tiempos, siguiendo ésta un patrón de titulación similar al obtenido bajo condiciones no radiactivas (ver Figura 27).

La actividad específica, por cadena, resultó ser de 730  $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$  para el  $\text{Fc}_\gamma\text{l-1'}$  y 1570  $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$  para el  $\text{Fc}_\gamma\text{l-5'}$ . La relación entre ambas actividades fue 2.15, valor éste que se correlaciona con la relación de residuos de glicina incorporados a los tiempos de modificación mencionados (146).

#### 4.3.3. Purificación de péptidos.

##### 4.3.3.1. Cromatografía de cambio de ión.

La Figura 34a muestra el perfil cromatográfico de un digerido trípico correspondiente al  $\text{Fc}_\gamma\text{l}$  modificado químicamente. Los mapas peptídicos para el  $\text{Fc}_\gamma\text{l-1'}$  y para el  $\text{Fc}_\gamma\text{l-5'}$  fueron idénticos. Esto puede reflejar el hecho de que la modificación de los grupos carboxilo no afecta el comportamiento/cromatográficos de los péptidos en el sistema particular descrito en 3.3.5.1.2.. Una solución alternativa sería pensar -- que los mismos grupos se han modificado a ambos tiempos de -- reacción.

El perfil de péptidos radiactivos, Figura 34b, apoya esta última hipótesis ya que para ambos tiempos de modificación se observaron ocho picos radiactivos. Como puede observarse, la cantidad de radiactividad incorporada aumentó con el tiempo de modificación. Una excepción a ello la constituyen los péptidos T6 y T7.



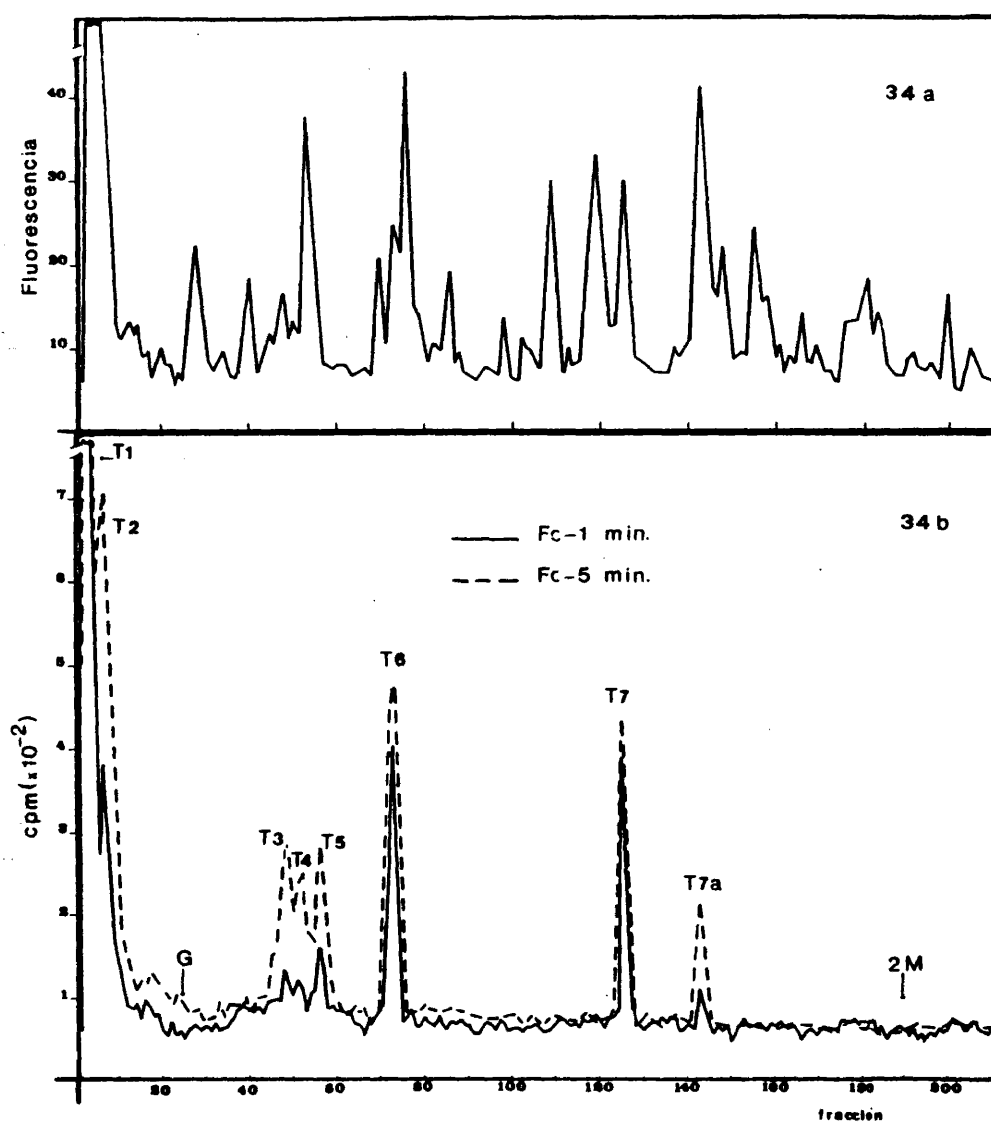


Figura 34.- (a) Perfil cromatográfico de un digerido tróptico correspondiente al  $\text{Fc}_\gamma 1$  modificado químicamente.  
(b) Perfil de péptidos radiactivos.

#### 4.3.3.2. Cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

La cromatografía líquida en capa fina mostró (datos no presentados) que el pico excluido T1 de la cromatografía - de cambio de ión contenía cinco péptidos radiactivos, tanto - en el digerido procedente de  $Fc\gamma 1-1'$  como de  $Fc\gamma 1-5'$ . Esta -- mezcla fue resuelta por cromatografía líquida de alta presión.

La Figura 35 muestra el perfil radiactivo del eluído de la columna Zorbax  $C_8$  cuando a través de ella se pasó el pico T1 procedente del digerido triptico de  $Fc\gamma 1-5'$ . Puede ob servarse la presencia de siete picos radiactivos.

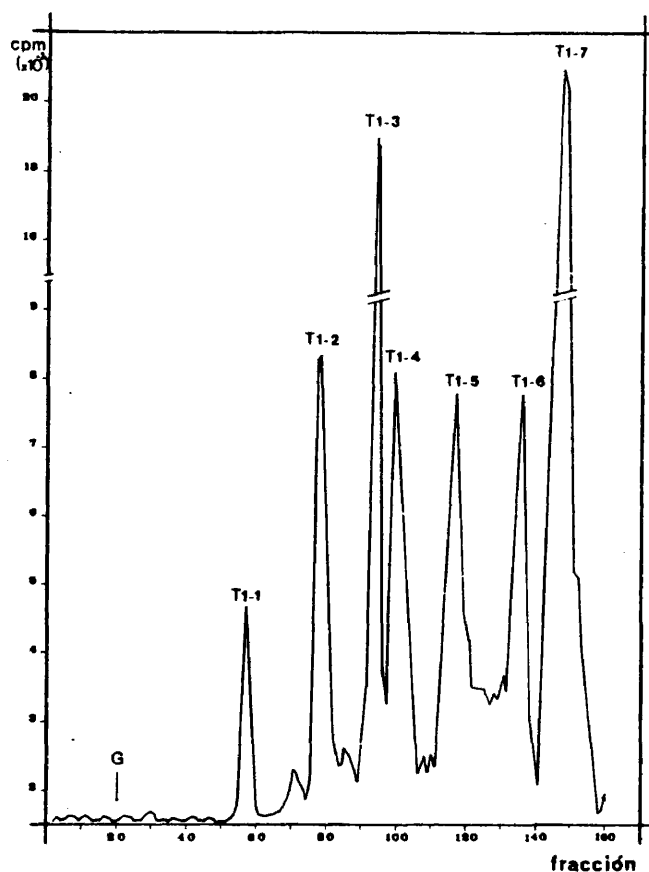


Figura 35

#### 4.3.4. Caracterización de péptidos radiactivos.

##### 4.3.4.1. Análisis de aminoácidos.

La Tabla 3 muestra la composición de aminoácidos - de los péptidos radiactivos obtenidos a partir de los picos - de las Figuras 34 y 35, correspondientes a 5 minutos de modificación.

El incremento en los valores de glicocola es debido a la incorporación de este aminoácido como consecuencia de la reacción de modificación con glicocola-etil-éster. Este incremento proporciona una medida cuantitativa de la extensión/ de la modificación de cada péptido de forma que en aquellos - péptidos que hayan sido modificados en un sólo residuo el incremento molar de glicocola puede correlacionarse directamente con la extensión de la modificación de ese residuo.

Como puede apreciarse, los péptidos T1-1 y T1-2 procedentes de la cromatografía líquida (Figura 35) presentan -- igual composición de aminoácidos. Lo mismo sucede con T1-4 y T1-7 y con T1-3 y T2.

##### 4.3.4.2. Determinación de la secuencia.

Esta se realizó con objeto de confirmar la identidad de los péptidos caracterizados por análisis de aminoácidos y para determinar el número y posición de los residuos modificados así como la extensión de su modificación.

La Figura 36 muestra el cromatograma perteneciente a un estándar que contiene 0.5 nmoles de la Pth de cada aminoácido especificado. A partir de los tiempos de retención señalados fue posible, por comparación, caracterizar cada residuo particular.

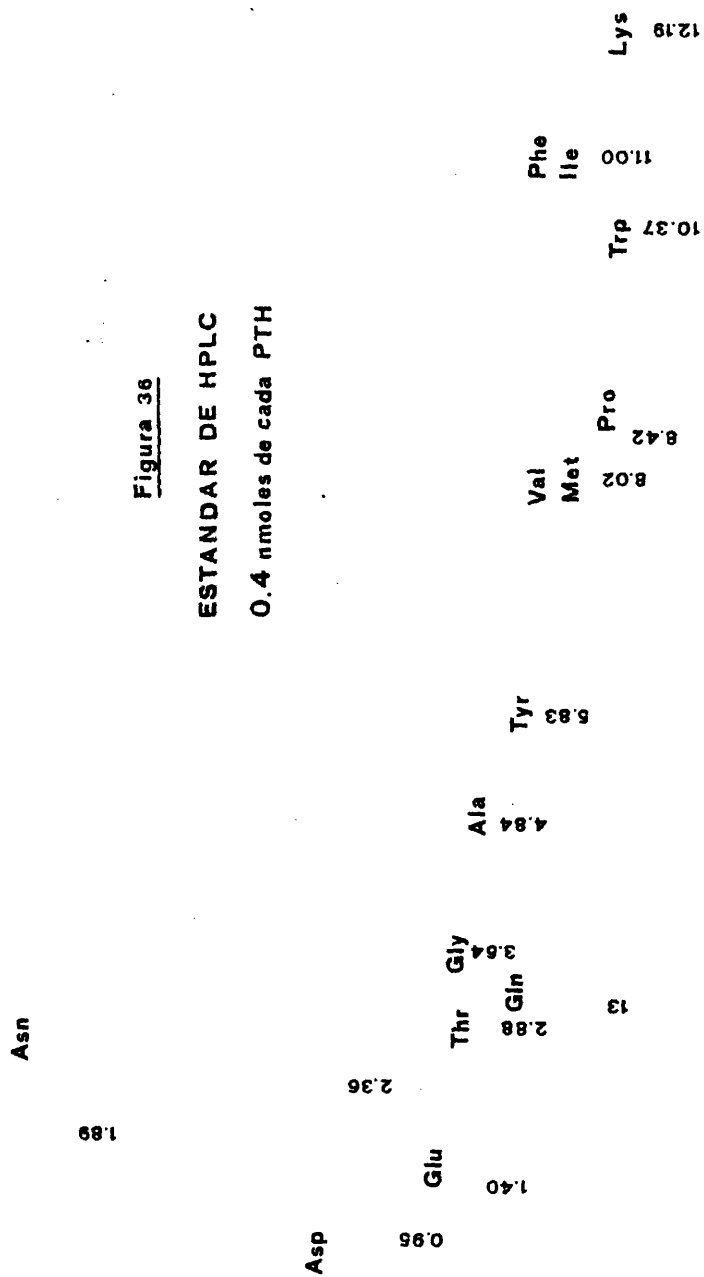
Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4. La identidad de los péptidos contenidos en T1-1 y T1-2 así co

Aminoácido	Tl-1	Tl-2	Tl-3	Tl-4	Tl-5(c)	Tl-6(c)	Tl-7	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Asp (b)	1.1(1)	1.1(1)		0.3(0)	(2)	(4)	0.3(0)	0.3(0)		1.2(0)	0.4(0)	0.9(1)	0.4(0)
Thr.	0.9(1)	1.0(0)			(2)					1.0(1)	1.1(1)	1.0(1)	
Ser	0.9(1)	1.1(1)	0.3(0)	2.4(3)	(1)	(2)	2.4(3)		0.3(0)	1.0(1)	0.4(0)		
Glu (b)	2.8(3)	2.8(3)	1.9(1)	0.3(0)	(3)	(4)		2.0(2)	1.3(1)	0.3(0)	2.1(2)	0.3(0)	1.0(1)
Pro			1.0(1)	0.9(1)	(2)	(2)	1.1(1)	1.0(1)					
Gly (d)	1.1(0)	1.3(0)	1.0(0)	1.9(1)		(2)	2.1(1)	1.0(0)	0.4(0)	0.8(0)	0.9(1)	0.8(0)	1.1(0)
Ala						(1)		0.8(2)					
Cys					(1)								
Val			0.8(1)		(6)	(1)		1.0(1)		0.4(0)	0.4(0)	0.8(1)	
Met										0.7(1)	0.9(1)		
Ile						(1)			0.9(1)	0.7(1)			
Leu				2.0(2)			2.0(2)		1.1(1)	1.0(1)		1.0(1)	
Tyr	1.9(2)	2.0(2)	0.9(1)		(2)	(2)		0.9(1)					1.0(1)
Phe					(1)								
His					(1)								
Lys					(1)	(1)			0.9(1)		1.0(1)	0.9(1)	1.1(1)
Trp						(1)							
Arg	1.0(1)	1.0(1)								0.8(1)			

-105-

Residue n° 293-301 293-301 345-349 440-446 256-274 371-392 440-446 345-349 327-334 249-255 356-360 410-414 318-320

**Tabla 3.-** Composición de aminoácidos de los péptidos radiactivos de Fc<sub>1</sub>-5'. Los valores están dados en residuos por mol. En paréntesis se indican los valores derivados de los análisis de secuencia. (b) Los valores de Asp y Glu incluyen los de Asn y Gln respectivamente. (c) La composición de aminoácidos de los péptidos Tl-5 y Tl-6 no se pudo determinar. Fueron identificados por secuenciación y contenían los péptidos 256-274 y 371-392 respectivamente. (d) Los valores de Gly incluyen la cantidad incorporada de Gly tras la modificación con el éster etílico de la glicocola.



**Figura 36**

**ESTANDAR DE HPLC**  
**0.4 nmoles de cada PTH**

PEPTIDO	SECUENCIA	RESIDUOS MODIFICADOS
T4	249 Asp-Thr-Leu-Met-Ile-Ser-Arg 255	Asp(249)
T1-5	256 Thr-Pro-Glu-Val-Thr-Cys-Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-His-Glu-Asp-Pro-Gln-Val-Lys 274	Glu(258) y Glu(269)
T1-1 y T1-2	293 Glu-Gln-Gln-Tyr-Asn-Ser-Thr-Tyr-Arg 301	Glu(293)
T7 y T7a	318 Glu-Tyr-Lys 320	Glu(318)
T3	327 Ala-Leu-Pro-Ala-Pro-Ile-Glu-Lys 334	Glu(333)
T1-3 y T2	345 Glu-Pro-Gln-Val-Tyr 349	Glu(345)
T5	356 Glu-Glu-Met-Thr-Lys 360	Glu(356)
T1-6	371 Gly-Phe-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ile-Ala-Val-Glu-Trp-Glu-Ser-Asn-Gly-Gln-Pro-Glu-Asn-Tyr-Lys 392	Asp(376), Glu(380) y Glu(382)
T6	410 Leu-Thr-Val-Asp-Lys 414	Asp(413)
T1-4 y T1-7	440 Ser-Leu-Ser-Leu-Ser-Pro-Gly 446	Gly(446)

Tabla 4.- Análisis de secuencia de los péptidos radiactivos obtenidos a partir del Fc<sub>γ</sub>1 modificado. Las flechas indican los residuos identificados directamente por HPLC. La secuencia propuesta para el péptido T1-6 está de acuerdo con la descrita previamente por Hofman y Parr (262)

mo la de T1-4 y T1-7 confirma, junto con los datos de la composición de aminoácidos, la existencia de cinco péptidos en el pico excluido T1.

Se confirmó, asimismo, la identidad de los péptidos presentes en T1-3 y T2.

El pico T7a contenía principalmente un péptido no radiactivo que abarcaba los residuos 275-288. La radiactividad de este pico era debida a la coelución de pequeñas cantidades del péptido presente en T7.

Por tanto, se obtuvieron 10 péptidos radiactivos a partir del Fc<sub>γ</sub>1 modificado tanto a 1 como a 5 minutos. Estos diez péptidos contenían 13 residuos modificados distribuidos de la siguiente manera: 6 en el dominio C<sub>γ</sub>2: Asp 249, Glu 258, Glu 269, Glu 293, Glu 318 y Glu 333 y 7 en el dominio C<sub>γ</sub>3: -- Glu 345, Glu 356, Asp 376, Glu 380, Glu 382, Asp 413 y el residuo COOH-terminal de la molécula, Gly 446.

#### 4.3.4.2.1. Cuantificación del marcaje.

Ya que los mismos residuos resultaron modificados a 1 y 5 minutos de reacción, era lógico suponer que los efectos tan drásticos observados sobre la funcionalidad entre ambos períodos de tiempo (146 y apartado 4.2.1.3.) eran debidos a una diferencia meramente cuantitativa de la extensión de su marcaje.

La actividad específica de los residuos marcados, después de 1 y 5 minutos, determinada según se describió en 3.3.6.2.2. se muestra en la Tabla 5.

Se pueden distinguir dos tipos de residuos: (a) Aquellos cuyo marcaje no aumenta con el tiempo de modificación y que son: Glu 269, Glu 318 en C<sub>γ</sub>2 y Asp 413 en C<sub>γ</sub>3; (b) Aquellos que presentan un aumento significativo en su actividad -

específica entre 1 y 5 minutos. Son: Asp 249, Glu 258, Glu -- 293 y Glu 333 en el C<sub>γ</sub>2; Glu 345, Glu 356, Asp 376, Glu 380, / Glu 382 y el residuo COOH-terminal Gly 446 en C<sub>γ</sub>3.

La actividad específica total, estimada por suma de / las actividades específicas de los residuos individuales, Tabla 5, para cada proteína, resultó ser el 46 y el 45% respecti vamente de la calculada a partir del Fc<sub>γ</sub>1 modificado a 1 y 5/ minutos (apartado 4.3.2.). Sin embargo, la relación de activi dades específicas a esos tiempos, estimada por ambos métodos/ es practicamente la misma, 2.1.

Residuos modificados	Actividad específica S (μCi/mmol)		Incremento relativo
	1 minuto	5 minutos	S <sub>5</sub> /S <sub>1</sub>
Asp 249	11	32	2.9
Glu 258	17	34	2.0
Glu 269	52	56	1.1
Glu 293	40	92	2.3
Glu 318	53	66	1.2
Glu 333	3	10	3.3.
Glu 345	13	65	5.0
Glu 356	16	36	2.3
Asp 376	14	43	3.1
Glu 380	20	45	2.3
Glu 382	14	27	1.9
Asp 413	47	51	1.1
Gly 446	38	120	3.2
TOTAL	338	712	2.1

Tabla 5



#### 4.3.5. Análisis de accesibilidad.

Estos análisis se realizaron con el objeto, si no - tanto de confirmar la exposición al solvente de algún residuo, sí al menos con la idea de poder descartar alguno de ellos. - Ya que la interpretación de los datos es problemática, al tener que recurrir a la representación en un plano de unas coordenadas espaciales, los datos obtenidos no se tomaron nunca/ como excluyentes sino que se utilizaron, y no en todos los casos, a título de mención de la confirmación de algún dato experimental conocido.

La Figura 37 muestra dos ejemplos opuestos que son/ representativos de lo anteriormente mencionado. Asp 249 no -- presenta al exterior de su  $C_{\alpha}$  ningún átomo de su cadena lateral. Sin embargo, Glu 269, uno de los residuos que se modificó extensivamente a 1 minuto de reacción, presenta su cadena/ completa sin tener átomos adyacentes y por tanto muy accesible al solvente. La representación es a escala ( $1\text{\AA} = 1\text{ cm}$ ) y/ como se describió en 3.3.7. el radio de la esfera considerada a partir del  $C_{\alpha}$  correspondiente es de  $7\text{\AA}$ .

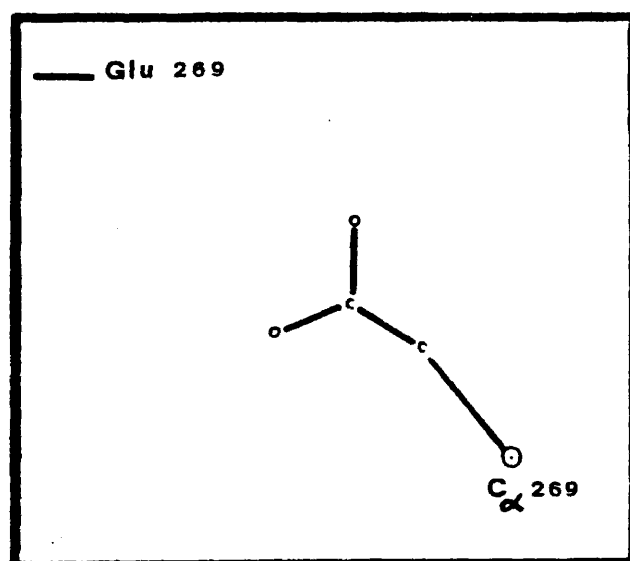
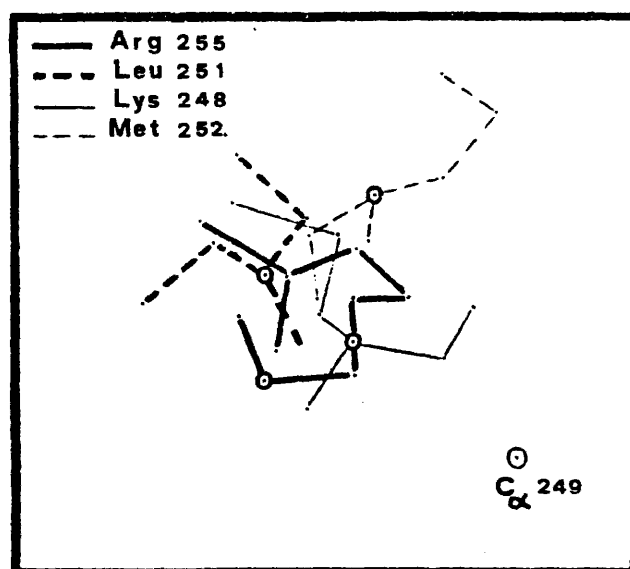


Figura 37.- Representación planar de las coordenadas espaciales de los átomos que rodean, en un radio de 7 Å  $C_{\alpha}$  de dos de los residuos modificados. 1 Å



5.- DISCUSSION.

La IgG obtenida por cromatografía en DEAE-celulosa/ resultó pura en base a los criterios utilizados.

La acción de la papaína sobre la IgG permite obtener el fragmento Fc tras cromatografía en DEAE-celulosa y filtración en gel. La presencia de una banda a un peso molecular de aproximadamente 50000 Dalton, en geles de poliacrilamida - presencia de SDS, banda que aparece en la zona de 25000 Dalton cuando la muestra es reducida, así como su comportamiento/ en inmunodifusión e inmunolectroforesis confirman como Fc la especie molecular purificada.

La modificación química se realizó en condiciones - tales que el proceso resultara altamente selectivo y no se -- produjeran reacciones secundarias, en Tyr e Hys, detectables/ por análisis de amino ácidos (146). La cinética observada fue semejante a la obtenida previamente (146) y practicamente --- idéntica a la descrita originalmente por Hbare y Koshland --- (249) para compuestos carboxílicos libres en solución. Asimismo, las condiciones de modificación se escogieron para evitar cambios conformacionales notables a tiempos pequeños de reacción (146).

La modificación química radiactiva realizada a 1 y/ 5 minutos de reacción exhibió una cinética análoga a la des-- crita para condiciones no radiactivas. De las 12 cadenas laterales ácidas modificadas, 9 correspondieron a residuos de Glu. Esto se debe, probablemente, a la mayor longitud de las cadenas laterales de este aminoácido con respecto a las de Asp,/ lo que resulta en una mayor accesibilidad de sus grupos carboxilo (259).

Al evaluar la contribución específica de cada grupo modificado a la pérdida de capacidad anticomplementaria o de/ unión a receptores celulares es importante tener en cuenta la

extensión de la modificación de cada cadena lateral al tiempo en que no se observa alteración funcional (1 minuto) y al --- tiempo en que la funcionalidad es abolida drásticamente (5 mi nutos). Esto es totalmente necesario ya que el número de residuos modificados a esos tiempos de reacción es, como se ha -- mencionado, el mismo.

Los análisis de aminoácidos de las proteínas modi-  
ficadas mostraban que el incremento molar de Gly, por cadena/  
de Fc, era 3 a 1 minuto de modificación y 7.6 a 5 minutos ---  
(146). Ya que en ambos casos el número de residuos modifica--  
dos es 13, eso significa que la extensión media de la modifi-  
cación por residuo es 23 y 59% respectivamente. Obviamente, -  
no todos los grupos se modifican en la misma extensión ya que  
su reactividad no tiene por qué ser la misma, además de no --  
serlo su accesibilidad. Sin embargo, la cuantificación del --  
porcentaje de modificaciòn de cada residuo es problemático ya  
que la actividad específica de los grupos marcados parece subestimar  
la extensión de la modificación. Así, mientras que la  
actividad específica por cadena de Fc<sub>γ</sub>1 modificado es 730  $\mu\text{Ci}/$   
 $\text{mmol}$  para 1 minuto y 1570  $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$  para 5 minutos, estos valores  
se ven reducidos a 338 y 712 (Tabla 5) cuando se suma la/  
actividad específica de cada residuo particular. Es decir, es  
ta segunda valoración subestima los datos en aproximadamente/  
un 50%.

No se ha encontrado explicación convincente para es  
ta discrepancia de valores ya que una pérdida de marca como -  
consecuencia de la deamidación producida durante la secuencia  
ción parece ser un hecho improbable.

Sin embargo, hay que tener presente que la estima--  
ción de los rendimientos repetitivos para péptidos de pequeño  
tamaño es lo suficientemente inexacta como para producir un -

error significativo en la valoración de las actividades específicas individuales que, lógicamente, afectarían a sus valores absolutos. Este error no debe afectar a los valores del incremento relativo de captación de radiactividad entre 1 y 5 minutos ya que el procedimiento seguido y los cálculos realizados para un residuo dado fueron idénticos para ambos tiempos de reacción. Esto queda confirmado por el hecho de que el incremento relativo total entre ambos períodos de modificación, calculado a partir de la contribución de cada residuo, 2.1, es idéntico al encontrado por estimación de la radiactividad incorporada tras la modificación y muy semejante al valor obtenido a partir del número de Gly incorporadas después de cada tiempo de modificación, 2.4. La pequeña desviación -- respecto al valor obtenido en los casos anteriores puede explicarse si se tiene en cuenta el error siempre inherente al cálculo de Gly a partir de análisis de aminoácido.

En consecuencia, los valores de S obtenidos no se pueden tomar formalmente como una medida de la extensión de la modificación. De ahí que, siempre que proceda, se hará mención al incremento relativo de la actividad específica particular, ya que va a ser este parámetro el que va a correlacionar con la pérdida de funcionalidad observada.

De los 13 residuos modificados, 6 están localizados en el dominio  $C_H^2$  puesto que esta región es la que une el Clq es probable que la modificación de sus residuos ácidos es directamente responsable de la pérdida de capacidad anticplementaria.

Glu 269 y Glu 318 no aumentan la extensión de su modificación después de 1 minuto de reacción (Tabla 5). Esto sugiere que ambos grupos han reaccionado en su totalidad en 1 minuto. Ya que a este tiempo no se observa una alteración fun

cional significativa se debe concluir que o bien las cadenas/laterales de ambos residuos no están implicadas en la capacidad de activación del complemento o que su modificación no es suficiente para abolir tal capacidad.

Glu 333 no se marca apreciablemente incluso después de 5 minutos de reacción. Este hecho queda confirmado por el bajo incremento de Gly observado en el péptido T3 (Tabla 3) - con respecto a la mayoría de los otros péptidos. Los análisis de accesibilidad realizados muestran que aunque su cadena lateral está expuesta al solvente, es muy probable que su grupo carboxilo esté formando un par iónico con la Lys 320 (107). Por tanto es poco probable que este residuo esté involucrado en la activación del complemento.

La cadena lateral del residuo Asp 249 está relativamente oculta a juzgar por nuestros análisis de accesibilidad. Además, está muy próxima al grupo guanidinio de la Arg 255 -- con la que probablemente esté formando un enlace iónico (107). De esta manera, aunque la radiactividad incorporada aumente -- significativamente entre 1 y 5 minutos, su participación en la activación de complemento parece improbable.

Tanto Glu 258 como Glu 293 aumentan la extensión de su modificación entre 1 y 5 minutos de reacción. Sus cadenas/laterales están expuestas al solvente. Glu 258 está próximo -- al azúcar formando, probablemente, un puente de hidrógeno con un residuo de galactosa (107). La cadena lateral del Glu 293 emerge de la superficie de la molécula. Parece, por tanto, probable que la modificación de uno o de los dos residuos puede ser responsable de la inactivación funcional del dominio C<sub>γ</sub>2/ después de la modificación de sus cadenas laterales ácidas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que esta modificación se suma a la antes mencionada de Glu 269 y Glu 318. Así, es posi

ble que la inactivación funcional sea el resultado de una cancelación acumulativa de cargas negativas más que a la modificación de un solo grupo.

Glu 258 y Glu 293 están en la cara C del dominio  $C_{\gamma}2$  (107, 114). Glu 269 está en el recodo que une la segunda banda  $\beta$  de la cara C con la primera banda de la capa 2, pero muy próximo a aquella. De esta manera es probable que algún área de esta cara C pueda estar primariamente involucrada en la activación de complemento a través de contactos que comprometan el establecimiento de enlaces salinos.

La participación de enlaces hidrofóbicos, además de las interacciones de carga, en la activación del complemento ha sido ya mencionada (138, 141, 142, 143, 147, 148). Es probable que su papel sea estabilizar los puentes salinos por exclusión del solvente. Presumiblemente este segundo paso permitiría la activación del Clq.

El área precisa del  $C_{\gamma}2$  a la que se une el Clq está, como ya se mencionó, aún en duda. El área sugerida por Burton y col. (132) incluye los residuos Glu 318 y Glu 333 que como se ha discutido anteriormente parecen no jugar un papel funcional significativo en nuestro sistema experimental. Sin embargo, el residuo Glu 293 está incluido en el segmento descrito por Brunhouse y Cebra (131) como involucrado en la unión del Clq. Ya que en la interacción entre macromoléculas suelen participar áreas relativamente distantes unas de otras, parece ocioso el atribuir a un residuo o a un segmento corto la propiedad de sitio efector. Más lógico parece pensar que una de las áreas comprometidas sea una que rodee al Glu 293.

La unión del 2, 5-diaminotolueno, un inhibidor del Clq, al segmento del  $C_{\gamma}2$  que abarca Ser 326 a Leu 326 (Sutton, comunicación personal) sugiere que este área, correspondiente/



al asa de la banda  $\beta$  sugerida por Burton y col. (132) puede -- ser importante. Glu 269 está cerca de ella de forma que, aunque su sola modificación no induce inactivación funcional, puede - contribuir a la unión del Clq.

Es conocido que la unión de la Proteína A al Fc no - inhibe la activación de complemento (214). Se sabe también de/ la capacidad del Fc $\gamma$ 4 para mediar tal activación mientras que/ la IgG4 correspondiente es incapaz de interaccionar con Cl, -- probablemente debido a su conformación en "T".(89).

Estos datos, sumados a la reconocida incapacidad de/ moléculas mutantes carentes de la región gozne para unir Cl y/ activar la vía clásica del complemento sugieren que la interac- ción Fc-Clq debe tener lugar en las partes más móviles del do- minio C $\gamma$ 2 que están situadas en su zona NH<sub>2</sub>-terminal (107,102).

A juzgar por el patrón de comportamiento observado/ en la Figura 32 la reacción de la Proteína A del *S. aureus* -- con el fragmento Fc parece ser independiente de la modifica-- ción de grupos carboxilo. Asimismo, la interacción parece no/ requerir un elevado grado de integridad conformacional ya que aún a 10 minutos de reacción la interacción observada es --- igual a la mostrada por la proteína nativa.

Esta segunda apreciación se basa en las variaciones detectadas en los espectros de dicroísmo circular a tiempos - superiores a 5 minutos de reacción (146). En ellos se observa una disminución en las bandas a 225 nm, a 291 nm correspon--- diente a Trp y en la zona entre 250 y 270 nm asignada esen--- cialmente a Tyr (260). Puede también apreciarse una pérdida - de estructura fina en esta región. En conjunto resulta un es- pectro semejante al que produce la suma de los espectros de - C $\gamma$ 2 más C $\gamma$ 3 que como se sabe no reproduce totalmente el espec- tro del Fc nativo, sobre todo en la región 220-240 nm (77).

Las dos sugerencias mencionadas son totalmente com- patibles con los datos de cristalografía de rayos X (107) en/ los que se muestra que el fragmento B de la Proteína A, su -- fragmento activo, se une a la zona de contacto C $\gamma$ 2-C $\gamma$ 3 involu- crando residuos de ambos dominios. A la estabilidad del único contacto que presumiblemente tiene lugar en condiciones fisio- lógicas contribuyen solamente cuatro puentes de hidrógeno: -- Ser 254-Gln 128, Asn 434-Asn 130, Leu 432-Tyr 133, Gln 311--- Asn 147. Como puede observarse no hay participación de ningún residuo ácido; de ahí que la modificación química realizada - no altere el comportamiento funcional del fragmento Fc.

Es probable, además, que debido al pequeño tamaño - del contacto (579 Å<sup>2</sup> de área accesible recubierta en el Fc, -- 107) éste sea independiente de los cambios conformacionales -

que hayan tenido lugar como consecuencia de la modificación.

El hecho de que residuos tales como Asp 376 y Glu - 380, que participan en la estabilización de la zona de contacto C<sub>Y</sub>2-C<sub>Y</sub>3 (107), hayan resultados modificados es una prueba - adicional de que la reacción con la Proteína A no involucra - la participación de los restos ácidos del Fc y es relativamente independiente de la conformación nativa.

La pequeña variación observada a 30 minutos de reacción, apenas un 25% de disminución en la capacidad de interacción, podría tener dos explicaciones: que fuera una conse--cuencia de los extensos cambios conformacionales observados a este tiempo de modificación o que a este tiempo se hubieran - modificado los residuos Asp 415 y/o Glu 430 que son recubier-tos por el Fragmento B durante la formación del contacto y -- que podrían de alguna forma alterar poco significativamente - el entorno necesario para aquel. Esta último parece poco probable debido al carácter esencialmente hidrofóbico del contacto 1.

La investigación de la interacción entre factores - reumatoides generales e IgG humana ha estado siempre complicada por la presencia de anticuerpos heterólogos y anticuerpos/ anti-alotipo dentro de la población de los factores reumatoides.

Este problema podría soslayarse, en cierta manera, / si se utilizara como anticuerpo sensibilizante una IgG de una especie filogenéticamente próxima a la humana (por ejemplo, - babuíno, 233). El hecho de que en nuestro ensayo se haya utilizado anticuerpo IgG de conejo no invalida nuestro sistema - experimental ya que la contribución de los anticuerpos antia-

lotipo y heterólogos a la aglutinación de los eritrocitos sensibilizados no excede nunca del 1% (título 1/32 de un suero normal frente a 1/10480 de nuestro suero patológico).

Lo que si continúa haciendo problemática cualquier interpretación de la reacción del factor reumatoide es la diversidad de especificidades presentes en su población. El hecho experimental de una disminución progresiva en la capacidad de inhibir la aglutinación por parte del fragmento Fc de la IgG humana modificado a distintos tiempos no es, por tanto, fácilmente interpretable.

Este comportamiento funcional observado podría ser consecuencia de tres hechos: a) De un progresivo aumento del número de restos modificados; b) De una progresiva cancelación de la carga de ciertos residuos particulares; c) De cambios conformacionales asociados a la modificación. La distinción, con nuestros datos, es imposible aunque presumiblemente el comportamiento funcional vendría marcado por la suma de los tres efectos. El que exista una frecuente contribución de la carga a la constitución de determinantes antigénicos supone que la perturbación de ésta puede alterar la estructura de dichos determinantes en muchos casos y en consecuencia la afinidad de los correspondientes anticuerpos. En cualquier caso, la multiplicidad de determinantes que interaccionan con el factor reumatoide y el desconocimiento de su localización molecular hacen que nuestros datos no permitan establecer una correlación entre la estructura y la función de este sistema.

Una posterior investigación utilizando factores reumatoides monoclonales de diversas especificidades podría contribuir a una localización más precisa de los diversos determinantes antigénicos del Fc implicados en la reacción con el factor reumatoide.

La modificación química de los grupos ácidos del -- fragmento Fc suprime casi totalmente la capacidad de unión a/ receptores celulares de neutrófilos ya a los 5 minutos de modificación.

Como se ha comentado en la Introducción, los estudios realizados utilizando dominios aislados sólo han conducido a una discrepancia de interpretaciones acerca de la localización topográfica del centro efector (179-182). Sin embargo, la necesidad de una estructura cuaternaria intacta en la porción Fc parece la proposición mejor sustentada (102, 201).

Uno de los datos más convincente a este respecto radica en el hecho de que tanto la IgG como el Fc reducidos son incapaces de inhibir la formación de rosetas en un ensayo comparable al realizado en nuestro estudio (201, 250). Aunque en ambos casos no se detectan cambios conformacionales por dicroismo circular, parece probable que la rotura de los enlaces disulfuro en la región gozne conduzca a alteraciones en las relaciones cuaternarias entre los dominios del Fc al incrementarse la flexibilidad segmental en torno a la región inter C<sub>γ</sub>2-C<sub>γ</sub>3 (80).

El hecho de que la modificación de más del 60% de los grupos amino de la IgG de conejo, accesibles al TNBS, no interfiera con la capacidad de formación de rosetas (250), parece descartar de alguna manera la participación de estos grupos, especialmente si se tiene en cuenta que no se han detectado cambios conformacionales por dicroismo circular. En estos mismos estudios, la modificación de grupos carboxilo induce un ligero cambio en el espectro que afecta a la banda de 225 nm. El mismo resultado se observa en nuestro estudio con/ el Fc humano (146). La interpretación de este cambio es difícil. Se ha sugerido que puede estar relacionado con la confor

mación de la región inter  $C_{\gamma 2}$ - $C_{\gamma 3}$ , pero la idea se apoya únicamente en el hecho de que dicha banda no se regenera por la suma de los espectros de dicroísmo circular de  $C_{\gamma 2}$  y  $C_{\gamma 3}$  aislados (77, 261). En cualquier caso ha de dejarse abierta la posibilidad de que la inactivación funcional observada en --- nuestro sistema sea, al menos en parte, debida a los pequeños cambios conformacionales inducidos por la modificación de grupos ácidos puesto que, como se ha mencionado más arriba, parece que la interacción IgG-receptor puede tener requerimientos conformacionales estrictos.

Nuestros datos son también compatibles con una participación directa de algunos grupos ácidos en la interacción con receptores. Como es sabido, el establecimiento de puentes/salinos en entornos apolares contribuye a la estabilización de algunas interacciones proteína-proteína ( ). Sin embargo la imposibilidad de relacionar el sitio efector con un dominio particular y el hecho de que los grupos ácidos modificados se encuentren repartidos en ambos dominios no permite hacer asignaciones.

Ciccimarra y col. (179) han sugerido que la región/que comprende los residuos 407-416 participa directamente en la interacción con receptores. Esta región comprende el Asp - 413, que resulta modificado y cuya actividad específica no -- aumenta entre 1 y 5 minutos. Ello sugiere que este residuo no es, por sí sólo, determinante en la interacción.

124

6.- CONCLUSIONES.

- 1.- La modificación química de proteínas es una aproximación/ experimental válida al estudio de las relaciones estructura-función siempre y cuando sea específica y no produzca/ cambios conformacionales significativos que dificulten o invaliden la interpretación de la dependencia de la actividad con los residuos modificados.

La localización de los restos modificados así como/ la cuantificación de la extensión de su modificación suponen un mayor acercamiento al problema y más aún si se tiene en cuenta que se ha podido discernir, en algunos casos, entre una modificación acompañada de integridad funcional y otra que conlleva una abolición drástica de actividad.

- 2.- Los papeles jugados por dominios individuales en la mediación de funciones efectoras parecen, en muchos casos, más complejos que los previstos en la Teoría de los dominios. El que ciertas actividades sean dependientes de altos órdenes de estructura que involucren la participación de pares de dominios o incluso la conformación nativa de la región Fc dificulta la interpretación de algunos datos experimentales.

- 3.- Unas pocas cadenas laterales ácidas localizadas en, o cerca de, la cara C de contacto del dominio C<sub>γ</sub>2 son esenciales para la activación del complemento. Los datos son, --asimismo, compatibles con la implicación de áreas relativamente distantes de la superficie y que podrían incluir/ el área alrededor del Glu 293 y quizás del Glu 258. No se excluye la participación del Glu 269 pero este residuo --no parece, por sí solo, ser un contacto esencial.



- 4.- Estos datos, unidos a los existentes en la literatura, nos permiten proponer la hipótesis de que la unión IgG-C1q es tá primariamente mediada por interacciones de carga que - podrían ser estabilizadas, en una segunda etapa, por el - establecimiento de enlaces no polares y por la exclusión/ del solvente en las áreas de contacto.
- 5.- Nuestros datos experimentales respecto a la interacción - con la Proteína A del S. aureus apoyan la idea de que los grupos ácidos no participan como elementos constituyentes de la interacción, de acuerdo con los datos de cristalografía de rayos X. Además, esta interacción parece no ser afectada por los cambios conformacionales que presumiblemente hayan tenido lugar en la zona de contacto C<sub>γ</sub>2-C<sub>γ</sub>3.
- 6.- El hecho de que los grupos ácidos modificados se encuentren repartidos por los dominios C<sub>γ</sub>2 y C<sub>γ</sub>3, sumado al desconocimiento de los centros efectores, imposibilitan la designación de residuos concretos como participantes en la zona de interacción con los receptores de neutrófilos. -- Ello está aún más complicado por la aparente sensibilidad a los cambios conformacionales de la unión de IgG a los receptores celulares.
- 7.- La multiplicidad de especificidades dentro de la población del factor reumatoide no permite asignar la topografía de los sitios antigénicos. Esta multiplicidad sugiere que la reacción mediada por el fragmento Fc<sub>γ</sub> es consecuencia/ de un atributo estructural de la IgG más bien que una verdadera función efectora.

124

7.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Klinman, J. (1976). En "Generation of diversity: A new/look". Pags. 127-149. Ed. Cunningham, A. Academic Press, N.Y.
- 2.- Kabat, E. & Wu, T. (1971). Ann. N.Y. Acad. Sci. 190, -- 382-393.
- 3.- Garver, F.A. & Hilschmann, N. (1970). Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 1591-1594.
- 4.- Smith, G., Hood, L. & Fitch, W. (1971). Ann. Rev. Bio--chem. 40, 969-1012.
- 5.- Hood, L., Campbell, J. & Elgin, S. (1975). Ann. Rev. Ge--net. 9, 305-353.
- 6.- Dreyer, W. & Bennett, J. (1965). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 54, 864-868.
- 7.- Burnet, F. (1959). En "The clonal selection theory of -acquired immunity". Vanderbilt Univ. Press, Nashville, / Tennessee.
- 8.- Weigert, M., Cesari, I., Yonkovich, S. & Cohn, M. (1970). Nature 228, 1045-1047.
- 9.- Jerne, N. (1971). Eur. J. Immunol. 1, 1-9.
- 10.- Cohn, M (1971). Ann. N.Y. Acad. Sci. 190, 529-584.
- 11.- Edelman, G. & Gally, J. (1967). Proc. Natl. Acad. Sci. / U.S.A. 57, 353-358.
- 12.- Gally, J. & Edelman, G. (1970). Nature 227, 341-348.
- 13.- Gilbert, W. (1978). Nature 271, 501.
- 14.- Rao, D., Rudikoff, S., Krutzsch, H. & Potter, M. (1979). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 2890-2894.
- 15.- Bernard, O., Hozumi, N. & Tonegawa, S. (1978). Cell 15, 1133-1144.
- 16.- Weigert, M., Gatmaitan, L., Loh, E., Schilling, J. & -- Hood, L. (1978). Nature 276, 785-790.
- 17.- Wu, T. & Kabat, E. (1970). J. Exp. Med. 132, 211-250.

- 18.- Capra, J. & Kindt, T. (1978). Immunogenetics 1, 417-427.
- 19.- Kabat, E., Wu, T. & Bilofsky, H. (1978). Proc. Natl. -- Acad. Sci. U.S.A. 75, 2429-2433.
- 20.- Tonegawa, S., Maxam, A., Tizard, R., Bernard, O. & Gilbert, W. (1978). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 2429-2433.
- 21.- Early, P., Huang, H., Davis, M., Calame, K. & Hood, L./ (1980). Cell 19, 981-992.
- 22.- Weigert, M. & Riblet, R. (1976). Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 41, 837-846.
- 23.- Weigert, M., Cesari, I., Yonkovich, S. & Cohn, M. (1970). Nature 228, 1045-1047.
- 24.- Tonegawa, S. (1976). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, - 203-207.
- 25.- Bernard, O., Hozumi, N. & Tonegawa, S. (1978). Cell 15,/ 1133-1144.
- 26.- Kolata, G. (1974). Science 186, 432-435.
- 27.- Leder, P., Honjo, T., Seidman, J. & Swan, D. (1976). Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 41, 855-862.
- 28.- Tonegawa, S., Hozumi, N., Matthysens, G. & Schuler, R./ (1976). Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 41, 877-889.
- 29.- Valbuena, O., Marcu, K., Weigert, M. & Perry, R. (1978)./ Nature 276, 780-784.
- 30.- Rabbitts, T., Matthysens, G. & Hamlyn, P. (1980). Nature 284, 238-243.
- 31.- Sakano, H., Huppi, K., Heinrich, G. & Tonegawa, S. (1979). 280, 288-294.
- 32.- Max, E., Seidman, J. & Leder, P. (1979). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 3450-3454.
- 33.- Seidman, J., Max, E. & Leder, P. (1979). Nature 280, 370-375.

- 34.- Max, E., Seidman, J., Miller, M. & Leder, P. (1980). *Cell* 21, 793-799.
- 35.- Sakano, H., Kurosawa, Y., Weigert, M. & Tonegawa, S. ---- (1981). *Nature* 290, 562-565.
- 36.- Pech, M., H8cht1, J., Schnell, H. & Zachau, H. (1981). -- *Nature* 291, 668-670.
- 37.- Weigert, M., Perry, R., Kelley, D., Hunkapiller, T., Schilling, J. & Hood, L. (1980). *Nature* 283, 497-499.
- 38.- Kurosawa, Y., von Boehmer, H., Haas, W., Sakano, H., Trounker, A. & Tonegawa, S. (1981). *Nature* 290, 565-570.
- 39.- Potter, M. (1978). *Advances in Immunology* 25, 141-212.
- 40.- McKean, D. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 3913-3917.
- 41.- Schechter, I. & Burstein, Y. (1976). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 3273-3277.
- 42.- Hozumi, N. & Tonegawa, S. (1976). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 3628-3632.
- 43.- Seidman, J., Leder, A., Edgell, M., Polsky, F., Tilghman, S., Tiemer, D. & Leder, P. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 3881-3885,
- 44.- Sakano, H., Maki, R., Kurosawa, Y., Roeder, W. & Tonegawa, S. (1980). *Nature* 286, 676-683.
- 45.- Ptashne, M., Backman, K., Humayun, M., Jeffrey, A., Maurer R., Meyer, B. & Sauer, R. (1976). *Science* 194, 156-161.
- 46.- Roberts, R. (1976). *Crit. Rev. Biochem.* 4, 123
- 47.- Barstad, P., Hubert, J., Hunkapiller, M., Schilling, J., Eaton, B., Richards, J., Weigert, M. & Hood, L. (1978). -- *Eur. J. Immunol.* 8, 497-503.
- 48.- Padlan, E., Davies, D., Pecht, I., Givol, D. & Wright, C./ (1976). *Col Spring Harb. Simp. Quant. Biol.* 41, 627-637.
- 49.- Capra, J. & Kindt, T. (1981). *Scand. J. Immunol.* 13, 205-209.

Nature 283, 351-356.

- 69.- Dunnick, W., Rabbitts, T. & Milstein, C. (1980). Nature/  
286, 669-675.
- 70.- Shimizu, A., Takahashi, N., Yamawaki, Y., Nishida, Y., -  
Kataoka, T. & Honjo, T. (1981). Nature 289, 149-153.
- 71.- Nishida, Y., Kataoka, T., Ishida, N., Nakai, S., Kishimo-  
to, T., Böttcher, I & Honjo, T. (1981). Proc. Natl. Acad.  
Sci. U.S.A. 78, 1581-1585.
- 72.- Obata, M., Kataoka, T., Nakai, S., Yamagishi, M., Taka-  
hashi, N., Yamawaki, Y., Nikaido, T., Shimizu, A. & Hon-  
jo, T. (1981). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 2437---  
2441.
- 73.- Radbruch, A., Liesegang, B. & Rajewsky, K. (1980). Proc.  
Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 2909-2913.
- 74.- Yon, J. (1969). En "Structure et dynamique conformatio-  
nelle des proteines". Ed. Hermann, A. Paris.
- 75.- Poljak, R., Amzel, L., Avey, H., Chen, B., Phizackerley,  
R. & Saul, F. (1973). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70,/  
3305-3310.
- 76.- Bunting, J. & Cathou, R. (1973). J. Mol. Biol. 77, 223-  
235.
- 77.- Ellerson, J., Yasmeen, D., Painter, R. & Dorrington, K./  
(1976). J. Immunol. 116, 510-517.
- 78.- Deisenhofer, J., Colman, P., Epp, O. & Hubber, R. (1976).  
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1421-1424.
- 79.- Sakano, H., Rogers, J., HÜppi, K., Brack, C., Traunecker,  
A., Maki, R., Wall, R. & Tonegawa, S. (1979). Nature 277,  
627-633.
- 80.- Cathou, R. & Dorrington, K. (1975). En "Biological macro  
molecules: Subunits in Biological Systems". Pags. 91-224.  
Eds. Timasheff, S. & Fasman, G. Dekker, N.Y.

- 50.- Leder, P., Max, E. & Seidman, J. (1980). Progress in Immunology 4, 34-50.
- 51.- Gough, N. & Bernard, O. (1981). Proc. Natl. Acad. Sci. - U.S.A. 78, 509-513.
- 52.- Schilling, J., Clevinger, B., Davie, J. & Hood, L. (1980). Nature 283, 35-40.
- 53.- Cory, S. & Adams, J. (1980). Cell 19, 37-51.
- 54.- Cory, S., Adams, J. & Kemp, D. (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 4943-4947.
- 55.- Raff, M. (1976). Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 41, 159-162.
- 56.- Kearney, J. Cooper, M., Klein, J., Abney, E., Parkhouse, R. & Lawton, A. (1977). J. Exp. Med. 146, 297-301.
- 57.- Lala, P., Layton, J. & Nossal, G. (1979). Eur. J. Immunol. 9, 39-44.
- 58.- Vitetta, E. & Uhr, J. (1977). Immunol. Rev. 37, 506
- 59.- Abney, E. & Parkhouse, R. (1974). Nature 252, 600-602.
- 60.- Liu, C., Tucker, P., Mushinski, J. & Blattner, F. (1980). Science 209, 1348-1353.
- 61.- Gally, J. & Edelman, G. (1970). Nature 227, 341-348.
- 62.- Sledge, C., Fair, D., Black, B., Krueger, R. & Hood, L./ (1976). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 923-927.
- 63.- Rabbitts, T. (1978). Nature 275, 291-296.
- 64.- Tonegawa, S., Maxam, A., Tizard, R., Bernard, O. & Gilbert, W. (1978). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 1485-1489.
- 65.- Honjo, T. & Kataoka, T. (1978). Proc. Natl. Acad. Sci. - U.S.A. 75, 2140-2144.
- 66.- Yaoita, Y. & Honjo, T. (1980). Nature 286, 850-853.
- 67.- Cory, S., Jackson, J. & Adams, J. (1980). Nature 285, -- 450-456.
- 68.- Rabbitts, T., Forster, A., Dunnick, W. & Bentley, D. (1980).

- 81.- Valentine, R. & Green, N. (1967). J. Mol. Biol. 27, 615-617.
- 82.- Marquart, M., Deisenhofer, J. & Huber, R. (1980). J. Mol. Biol. 141, 369-391.
- 83.- Yguerabide, J., Epstein, H. & Stryer, L. (1970). J. Mol. Biol. 51, 573-590.
- 84.- Lovejoy, C., Holowka, D. & Cathou, R. (1977). Biochemistry 16, 3668-3672.
- 85.- Werner, T., Bunting, J. & Cathou, R. (1972). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69, 795-799.
- 86.- Luedkte, R., Owen, C. & Karush, F. (1980). Biochemistry/ 19, 1182-1192.
- 87.- Barisas, B., Singer, S. & Sturtevant, J. (1977). Immunochemistry 14, 247-252.
- 88.- Shur, P. & Christian, G. (1964). J. Exp. Med. 120, 531--545.
- 89.- Isenman, D., Dorrington, K. & Painter, R. (1975). J. Immunol. 114, 1726-1729.
- 90.- Romans, D., Tilley, C., Crookston, M., Falk, R. & Dorrington, K. (1977). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 2531--2535.
- 91.- Lawrence, D., Weigle, W. & Spiegelberg, H. (1975). J. -- Clin. Invest. 55, 368-376.
- 92.- Michaelsen, T., Wilsloff, F. & Natvig, J. (1975). Scand. J. Immunol. 4, 71-78.
- 93.- Wiederman, G., Miescher, P. & Franklin, E. (1963). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 113, 609-613.
- 94.- Olins, D. & Edelman, G. (1964). J. Exp. Med. 119, 789-815.
- 95.- Chan, L. & Cathou, R. (1977). J. Mol. Biol. 112, 653-656.
- 96.- Björk, I. & Tanford, C. (1971). Biochemistry 10, 1289---1285.



- 97.- Goers, J., Schumaker, V., Glovsky, M., Rebek, J. & Müller-Eberhard, H. (1975). J. Biol. Chem. 250, 4918-4925.
- 98.- Seegan, G., Smith, C. & Schumaker, V. (1979). Proc. Natl./ Acad. Sci. U.S.A. 76, 907-911.
- 99.- Dorrington, K. (1978). Can. J. Biochem. 56, 1087-1101.
- 100.- López de Castro, J.A. (1975). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense. Madrid.
- 101.- Franklin, E. & Frangione, B. (1975). Contemporary topics - in molecular immunology 4, 89.
- 102.- Klein, M., Haeffner-Cavaillon, N., Isenman, D., Rivat, C., Navia, M., Davies, D. & Dorrington, K. (1981). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 524-528.
- 103.- Romans, D., Tilley, C. & Dorrington, K. (1979). Mol. Immunol. 16, 851-858.
- 104.- Easterbrook-Smith, S. & Dwek, R. (1980). F.E.B.S. lett. - 121, 253-256.
- 105.- Edelman, G., Cunningham, B., Gall, W., Gottlieb, P., Ruttishauser, U. & Waxdal, M. (1969). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 63, 78-85.
- 106.- Deisenhofer, J., Colman, P., Huber, R., Haupt, H. & Schwick, G. (1976). Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 435-445.
- 107.- Deisenhofer, J. (1981). Biochemistry 20, 2361-2370.
- 108.- Turner, M. & Bennich, H. (1968). Biochem. J. 107, 171-178.
- 109.- Poljak, R., Amzel, L., Chen, B., Phizackerley, R. & Saul, F. (1974). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 3440-3444.
- 110.- Segal, D., Padlan, E., Cohen, G., Rudikoff, S., Potter, M. & Davies, D. (1974). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, -- 4298-4302.
- 111.- Matsushima, M., Marquart, M., Jones, T., Colman, P., Bartels, K., Huber, R. & Palm, W. (1978). J. Mol. Biol. 121, 441-459.

- 112.- Berggard, I. (1974). Progress in Immunology II 1, 261-265.
- 113.- Saul, F., Amzel, L. & Poljak, R. (1978). J. Biol. Chem. 253, 585-597.
- 114.- Beale, D. & Feinstein, A. (1976). Quart. Rev. Biophys./9, 135-180.
- 115.- Low, T., Lin, Y. & Putnam, F. (1976). Science 191, 390-391.
- 116.- Porter, R. (1959). Biochem. J. 73, 119-126.
- 117.- Augener, W., Grey, H., Looper, N. & Müller-Eberhard, H. (1971). Immunochemistry 8, 1011-1020.
- 118.- Reid, K., Sim, R. & Fairers, A. (1977). Biochem. J. 161, 239-245.
- 119.- Schumaker, V., Calcott, M., Spiegelberg, H. & Müller-Eberhard, H. (1976). Biochemistry 15, 5175-5181.
- 120.- Golan, M., Hitschold, T. & Loos, M. (1981). F.E.B.S. --lett. 128, 281-285.
- 121.- Reid, K., Lowe, D. & Porter, R. (1972). Biochem. J. 130, 749-763.
- 122.- Reid, K. & Thompson, E. (1978). Biochem. J. 173, 863---868.
- 123.- Shinkai, H. & Yonemasu, K. (1979). Biochem. J. 177, ---847-852.
- 124.- Reid, K. & Porter, R. (1976). Biochem. J. 155, 19-23.
- 125.- Brodsky-Doyle, B., Leonard, K. & Reid, K. (1976). Biochem. J. 159, 279-286.
- 126.- Piez, K. & Gross, J. (1960). J. Biol. Chem. 235, 995---998.
- 127.- Gilmour, S., Randall, J., Willan, K., Dwek, R. & Torbet, J. (1980). Nature 285, 512-514.
- 128.- Wautier, J., Souchon, H., Reid, K., Peltier, A. & Caen,/

- J. (1977). *Immunochemistry* 14, 763-766.
- 129.- Yasmeen, D., Ellerson, J., Dorrington, K. & Painter, R./ (1976). *J. Immunol.* 116, 518-526.
- 130.- Poljak, R. (1978). *CRC Crit. Rev. Biochem.* 5, 45-84.
- 131.- Brunhouse, R. & Cebra, J. (1979). *Mol. Immunol.* 16, 907-917.
- 132.- Burton, D., Boyd, j., Brampton, A., Easterbrook-Smith, S., Emanuel, E., Novotny, J., Rademacher, W., van Schravendijk, M., Sternberg, M. & Dwek, R. (1980). *Nature* 288, -338-344.
- 133.- Sledge, C. & Bing, D. (1973). *J. Biol. Chem.* 248, 2818--2823.
- 134.- Rent, R., Ertel, N., Einstein, R. & Gewurz, H. (1975). - *J. Immunol.* 114, 120-124.
- 135.- Hughes-Jones, C. & Gardner, B. (1978). *Immunology* 34, --459-463.
- 136.- Lin, T. & Fletcher, D. (1978). *Immunochemistry* 15, 107--117.
- 137.- Allan, R., Rodrick, M., Knobel, H. & Isliker, H. (1979). *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.* 58, 140-148.
- 138.- Easterbrook-Smith, S., Zavodszky, P., Willan, K., Gettings, P. & Dwek, R. (1978). *Biochem. Soc. Trans.* 6, 1126-1132.
- 139.- Cooper, N. (1973). *Contemporary topics in molecular immunology* 2, 155.
- 140.- Fiedel, B., Rent, R., Myhrman, R. & Gewurz, H. (1976). - *Immunology* 30, 161-169.
- 141.- Isenman, D., Ellerson, J., Painter, R. & Dorrington, K./ (1977). *Biochemistry*, 16, 233-240.
- 142.- Allan, R. & Isliker, H. (1974). *Immunochemistry* 11, 175-180.
- 143.- Allan, R. & Isliker, H. (1974). *Immunochemistry* 11, 243-

- 248.
- 144.- Cohen, S. & Becker, E. (1968). J. Immunol. 100, 395-402.
- 145.- Cohen, S. & Becker, E. (1968). J. Immunol. 100, 403-406.
- 146.- Vivanco F., Bragado, R., Albar, J.P., Juárez, C. & Ortiz, F. (1980). Mol. Immunol. 17, 327-336.
- 147.- Johnson, B. & Thames, K. (1976). J. Immunol. 117, 1491--1494.
- 148.- Boackle, R., Johnson, B: & Caughman, B. (1979). Nature - 282, 742-743.
- 149.- Lee, J. & Painter, R. (1980). Mol. Immunol. 17, 1155-1162.
- 150.- Kehoe, J. & Fougereau, M. (1969). Nature 224, 1212-1213.
- 151.- Dickler, H. (1976). Advances in Immunology 24, 167-214.
- 152.- Lee, S. & Paraskevas, F. (1972). J. Immunol. 109, 1262--1271.
- 153.- Yoshida, T. & Andersson, B. (1972). Scand. J. Immunol. 1, 401-405.
- 154.- Ferrarini, M., Moretta, L., Abrile, R. & Durante, M. (1975). Eur. J. Immunol. 5, 70-72.
- 155.- Moretta, L., Ferrarini, M., Durante, M. & Mingari, M. --- (1975). Eur. J. Immunol. 5, 565-569.
- 156.- Winchester, R., Fu, S., Hoffman, T. & Kunkel, H. (1975)./ J. Immunol. 114, 1210-1212.
- 157.- Basten, A., Miller, J., Sprent, J. & Pye, J. (1972). J. - Exp. Med. 135, 610-626.
- 158.- Dickler, H. & Kunkel, H. (1972). J. Exp. Med. 136, 191-196.
- 159.- McConnell, I. & Hurd, C. (1976). Immunology 30, 835-839.
- 160.- Gmelig-Meyling, F. van der Ham, M. & Ballieux, R. (1976). Scand. J. Immunol. 5, 487-493.
- 161.- Moretta, L., Mingari, C., Webb, R., Pearl, E., Lydyard, P., Grossi, C. & Cooper, M. (1977). Eur. J. Immunol. 7, 696--700.

- 162.- Pred'homme, J., Gonnot, M., Fellous, M. & Seligmann, M. (1979). *Scan. J. Immunol.* 10, 207-211.
- 163.- Ferrarini, M., Hoffman, T., Fu, S., Winchester, R. & -- Kunkel, H. (1977). *J. Immunol.* 119, 1525-1529.
- 164.- Strober, W., Hague, N., Lum, L. & Henkart, P. (1978). - *J. Immunol.* 121, 2440-2445.
- 165.- Lum, L., Muchmore, A., Keren, D., Decker, J., Koski, I., Strober, W. & Blaese, R. (1979). *J. Immunol.* 122, 65-69.
- 166.- Yodoi, J. & Ishizaka, K. (1980). *J. Immunol.* 124, 934--943.
- 167.- Sjoberg, O. (1980). *Scand. J. Immunol.* 11, 377-381.
- 168.- Bast, B., Roholl, P., Gmelig-Meyling, F. & Ballieux, R./ (1980). *Eur. J. Immunol.* 10, 192-197.
- 169.- Ramasami, R., Secher, D. & Adetugbo, K. *Nature* 253, 656.
- 170.- Wisloff, F., Michaelsen, T. & Froland, S. (1974). *Scand. J. Immunol.* 3, 29 - 34.
- 171.- Moretta, L., Mingari, A., Moretta, A., Haynes, B. & Fauci, A. (1980). *Progress in Immunology* 4, 223-238.
- 172.- Suzuki, T., Sadasivan, R., Wood, G. & Boyer, W. (1980). *Mol. Immunol.* 17, 491-503.
- 173.- Suzuki, T., Taki, T., Hachimine, K. & Sadasivan, R. --- (1981). *Mol. Immunol.* 18, 55-65.
- 174.- Suzuki, T., Sadasivan, R., Taki, T., Stechschulte, J.,/ Balentine, L. & Helmkamp, G. (1980). *Biochemistry* 19, - 6037-6044.
- 175.- Uhr, J. (1965). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 54, 1599-1606.
- 176.- Hay, D. & Roitt, I. (1972). *Eur. J. Immunol.* 2, 257-261.
- 177.- Yasmeen, D., Ellerson, J., Dorrington, K. & Painter, R. (1973). *J. Immunol.* 110, 1706-1709.
- 178.- Okafor, G., Turner, M. & Hay, F. (1974). *Nature* 248, --

228-230.

- 179.- Ciccimarra, F., Rosen, F & Merler, E. (1975). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 2081-2083.
- 180.- Abramson, N., Gelfand, E., Jandl, J. & Rosen, F. (1970). J. Exp. Med. 132, 1207-1215.
- 181.- Ovary, Z., Saluk, P., Quijada, L. & Lamm, E. (1976). J. Immunol. 116, 1265-1271.
- 182.- Huber, H., Douglas, S., Nusbacher, J., Kochwa, S. & Rosenfield, R. (1971). Nature 229, 419-420.
- 183.- Barnnett Foster, D., Dorrington, K. & Painter, R. (1980). J. Immunol. 124, 2186-2190.
- 184.- Unkeless, J. & Eisen, H. (1975). J. Exp. Med. 142, 1520-1533.
- 185.- Ganczakowski, M. & Leslie, R. (1979). Immunology 36, 487-494.
- 186.- Alexander, E., Titus, J. & Segal, D. (1979). J. Immunol. 123, 295-302.
- 187.- Griffin, F., Griffin, J., Leider, J. & Silverstein, S. - (1975). J. Exp. Med. 142, 1263-1282.
- 188.- Griffin, F., Griffin, J. & Silverstein, S. (1976). J. -- Exp. Med. 144, 788-809.
- 189.- Ishizaka, T., Soto, C. & Ishizaka, K. (1973). J. Immunol. 111, 500-511.
- 190.- Kulczycki, A., & Metzger, H. (1974). J. Exp. Med. 140, -- 1676-1695.
- 191.- Conrad, D., Bazin, H., Sehon, A. & Froese, A. (1975). J./ Immunol. 114, 1688-1691.
- 192.- Ishizaka, K. & Ishizaka, T. (1971). Progress in Immunology 1, 859.
- 193.- Takatsu, K., Ishizaka, T. & Ishizaka, K. (1975). J. Immunol. 114, 1838-1845.

- 194.- Dorrington, K. & Bennich, H. (1973). J. Biol. Chem. 248, 8378-8384.
- 195.- Minta, J. & Painter, R. (1972). Immunochemistry 9, 1041-1048.
- 196.- Prahl, J. (1967). Biochem. J. 104, 647-655.
- 197.- Utsumi, S. (1969). Biochem. J. 112, 343-355.
- 198.- Stewart, G., Smith, A. & Stanworth, D. (1973). Immunochemistry 10, 755-760.
- 199.- Conrad, D., Froese, A., Ishizaka, T. & Ishizaka, K. --- (1978). J. Immunol. 120, 507-512.
- 200.- Messner, R. & Jelinek, J. (1970). J. Clin. Invest. 49, / 2165-2171.
- 201.- Barnett Foster, D., Dorrington, K. & Painter, R. (1978). J. Immunol. 120, 1952-1956.
- 202.- Gitlin, D., Kumate, J., Urrusti, J. & Morales, C. (1964). J. Clin. Invest. 43, 1938-1951.
- 203.- Tsay, D., Ogden, D. & Schlamowitz, M. (1980). J. Immunol. 124, 1562-1565.
- 204.- Jones, E. & Waldmann, T. (1972). J. Clin. Invest. 51, - 2916-2927.
- 205.- Waldmann, T. & Jones, E. (1975). En "Maternofoetal transmission of immunoglobulins". Pag. 123. Ed. Hemmings, W. Cambridge University Press, Cambridge.
- 206.- Sonoda, S. & Schlamowitz, M. (1972). J. Immunol. 108, - 807-817.
- 207.- Hemmings, W., Jones, R. & Faulk, D. (1975). Immunology/ 28, 411-418.
- 208.- Brambell, F. (1966). Lancet 2, 1087-1093.
- 209.- Wild, A. (1975). Phil. Trans. R. Soc. 271, 395-403.
- 210.- Hemmings, W. (1975). En "Maternofoetal transmission of immunoglobulins". Pag. 91. Ed. Hemmings, W. Cambridge -

University Press, Cambridge.

- 211.- Anderson, R., Goldstein, J. & Brown, M. (1976). Proc. - Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 2434-2438.
- 212.- McNabb, T., Koh, T., Dorrington, K. & Painter, R. (1976). J. Immunol. 117, 882-888.
- 213.- Van der Meulen, J., McNabb, T., Haeffner-Cavaillon, N., Klein, M. & Dorrington, K. (1980). J. Immunol. 124, --- 500-507.
- 214.- Wright, C., Willan, K., Sjødahl, J., Burton, D. & Dwek, R. (1977). Biochem. J. 167, 661-668.
- 215.- Stalenheim, G. & Sjöquist, J. (1970). J. Immunol. 105, / 944-948.
- 216.- Hawiger, J., Marney, S., Colley, D. & Des Prez, R. (1972). J. Exp. Med. 136, 68-80.
- 217.- Forsgren, A. & Sjöquist, J. (1967). J. Immunol. 99, 19-24.
- 218.- Kronwall, G. & Frommel, D. (1970). Immunochemistry 7, - 124-126.
- 219.- Lancet, D., Isenman, D., Sjødahl, J., Sjöquist, J. & -- Pecht, I. (1978). Biochem. Biophys. Res. Commun. 85, -- 608-614.
- 220.- Kronwall, G. & Williams, R. (1969). J. Immunol. 103. -- 828-833.
- 221.- Kronwall, G., Messner, R. & Williams, R. (1970). J. Immunol. 105, 1353-1359.
- 222.- Deisenhofer, J., Jones, T. & Huber, R. (1978). Hoppe--- Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 975-985.
- 223.- Stewart, G., Varro, R. & Stanworth, D. (1978). Immunology 35, 785-791.
- 224.- Inganäs, M., Johansson, T. & Bennich, H. (1980). Scand. J. Immunol. 12, 23-31.



- 225.- Inganäs, M. (1981). Scand. J. Immunol. 13, 343-352.
- 226.- Forsgren, A. & Nordstrom, K. (1974). Ann. N.Y. Acad. Sci. 236, 252-266.
- 227.- Biguzzi, S. (1979). Eur. J. Immunol. 9, 52-60.
- 228.- Kasahara, T., Harada, H., Shiori-Nakano, K., Imai, M. & Sano, T. (1981). Immunology 42, 175-184.
- 229.- Forsgren, A., Svedjelund, A. & Wigzell, H. (1976). Eur. J. Immunol. 6, 207-213.
- 230.- Möller, G. & Landwall, P. (1977). Scand. J. Immunol. 6, 357-366.
- 231.- Sjødall, J. & Möller, G. (1979). Scand. J. Immunol. 10, 593-596.
- 232.- McDuffie, F., Oikawa, T. & Nishi, I. (1965). J. Immunol. 95, 614-620.
- 233.- Stewart, G., Hunneyball, I. & Stanworth, D. (1975). Immunochemistry 12, 657-662.
- 234.- Stewart, G., Smith, A. & Stanworth, D. (1973). Immunochemistry 10, 755-760.
- 235.- Gaarder, P. & Michaelsen, T. (1974). Acta Path. Microbiol. Scand. 82, 733-741.
- 236.- Hunneyball, I. & Stanworth, D. (1976). Immunology 30, - 881-894.
- 237.- Fudenberg, H. (1980). Scand. J. Immunol. 12, 459-465.
- 238.- Duc Doden, M. & Quash, G. (1981). Immunology 42, 401-408.
- 239.- Vaughan, J. (1979). J. Rheum. 6, 381-388.
- 240.- Vivanco, F. (1978). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense. Madrid.
- 241.- Peterson, E. & Sober, H. (1962). Methods in Enzymology/ 5, 3-27.
- 242.- López de Castro, J.A., Vivanco, F. & Ortiz, F. (1977). - Biochem. Biophys. Res. Commun. 78, 1319-1326.

- 243.- Stanworth, D. & Turner, M. (1973). En "Handbook of experimental Immunology". Vol. I, Cap. 10. Ed. Weir, D. Blackwell, London.
- 244.- Ouchterlony, O. (1958). Progress in Allergy 5, 1-78.
- 245.- Scheidegger, R. (1955). Int. Archs. Allergy Appl. Immunol. 7, 103-110.
- 246.- Andrews, P. (1969). Meth. Biochem. Analysis 18, 1-53.
- 247.- Weber, K. & Osborn, M. (1975). En "The Proteins". Vol. 1, Pags. 179-223. Eds. Neurath, H. & Hill, R. Academic Press, N.Y.
- 248.- Hoare, D. & Koshland, E. (1967). J. Biol. Chem. 242, 2447-2453.
- 249.- Boyum, A. (1968). Nature 21, 793-794.
- 250.- Juárez, C. (1981). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias - Químicas, Universidad Complutense. Madrid.
- 251.- Waaler, E. (1940). Acta Path. Microbiol. Scand. 17, 172---178.
- 252.- Herman, V. & Vanaman, T. (1977). Methods in Enzymology 47, 220-236.
- 253.- Nakai, N., Lai, C. & Horecker, L. (1974). Anal. Biochem./ 58, 563-570.
- 254.- Gracy, R. (1977). Methods in Enzymology 47, 220-236.
- 255.- Klapper, D., Wilde, C. & Capra, D. (1978). Anal. Biochem. 85, 126-131.
- 256.- Tarr, G., Beecher, J., Bell, M. & McKean, D. (1978). Anal. Biochem. 84, 622-627.
- 257.- Ilse, D. & Edman, P. (1963). Australian J. Chem. 16, 411.
- 258.- Van Orden, H. & Carpenter, F. (1964). Biochem. Biophys. - Res. Commun. 5, 399-403.
- 259.- Schulz, G. & Schirmer, R. (1979). En "Principles of protein structure". Pag. 12. Ed. Cantor, Ch. Springer-Verlag,

Berlin.

- 260.- Cathou, R., Kulczycki, A. & Haber, E. (1968). Biochemistry 7, 3958-3963.
- 261.- Stewart, G., Johnson, P., Barret, M., Scopes, P. & Stan--  
worth, D. (1977). Immunochemistry 14, 263-268.
- 262.- Hofman, T. & Parr, D.M. (1979). Mol. Immunol. 16, 923-925.

